

**FERMENTASYONLA ETANOL ÜRETİMİNDE  
ETANOL VERİMİNİN ARTTIRILMASI**

**Dilek SOYUDURU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**EYLÜL 2007  
ANKARA**

Dilek SOYUDURU tarafından hazırlanan FERMENTASYONLA ETANOL ÜRETİMİNDE ETANOL VERİMİNİN ARTTIRILMASI adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Mübeccel ERGUN .....  
Tez Danışmanı, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Kimya Mühendisliği Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yavuz BEYATLI .....  
Biyoloji Bölümü, Gazi Üniversitesi  
Prof. Dr. Mübeccel ERGUN .....  
Kimya Mühendisliği, Gazi Üniversitesi  
Prof. Dr. Canan CABBAR .....  
Kimya Mühendisliği, Gazi Üniversitesi  
Doç. Dr. İrfan AR .....  
Kimya Mühendisliği, Gazi Üniversitesi  
Prof. Dr. Nurdan SARAÇOĞLU .....  
Kimya Mühendisliği, Gazi Üniversitesi

Tarih: 14/ 09/ 2007

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Nermin ERTAN .....  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atf yapıldığını bildiririm.

Dilek SOYUDURU

**FERMENTASYONLA ETANOL ÜRETİMİNDE  
ETANOL VERİMİNİN ARTTIRILMASI  
(Yüksek Lisans Tezi )**

**Dilek SOYUDURU**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Eylül 2007**

**ÖZET**

Gelişen teknoloji, artan dünya nüfusu, azalan petrol rezervleri ve maliyetin yükselmesiyle ülke ekonomisine doğrudan ve büyük katkı sağlaması, ulusal kaynakların korunması ve değerlendirilmesi açısından fermentasyonla alkol üretimi güncellik kazanmıştır. Bu nedenle etanol verimini arttıracak fermentasyon koşullarının belirlenmesi önem kazanmıştır. Bu çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* mayası kullanılarak yapay melastan etanol üretiminde, fermentasyon ortamına eklenen maddelerin, etanol derişimi, etanol yüzdesi ve üretim hızı üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışma üç aşamada yapılmıştır. İlk aşamada ortama etanol üretimi üzerine olumlu etkileri literatürde belirlenmiş olan zeolit NaY, montmorillonit (MNT) ve klinoptilolit (KLN) başlangıç pH değeri 4,5 ve değişen şeker derişimi 200 ve 300 gL<sup>-1</sup> değerlerinde ortama ilave edilmiştir. Bu şartlar altında ortama NaY eklenmesiyle 200 gL<sup>-1</sup> şeker ve 15 gL<sup>-1</sup> NaY içeren ortamda üretim hızı artmıştır. Ortamda 10 gL<sup>-1</sup> MNT bulunmasıyla, etanol derişimi artmış, aynı zamanda 200 gL<sup>-1</sup> şeker içeren ortamda maksimum derişime ulaşmak için geçen süre azalmış ve etanol üretim hızı % 16 oranında artmıştır. 5 gL<sup>-1</sup> KLN varlığı etanol üretim hızını %50 oranında artmıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında

fermentasyon ortamına aktif karbon, bentonit ve talk ilave edilmiş, deneyler  $100 \text{ gL}^{-1}$  şeker varlığında yapılmıştır.  $10 \text{ gL}^{-1}$  bentonit varlığında teorik verim % 6 oranında artmıştır.  $10 \text{ gL}^{-1}$  aktif karbon varlığında en yüksek verime ulaşmak için geçen süre azalmıştır. Talk ilavesi fermentasyonu olumsuz yönde etkilemiştir. Çalışmanın üçüncü bölümünde, Box Wilson deneysel tasarım yöntemi kullanılarak Na, Ca ve Mg iyonlarının etanol fermentasyonunda kendi aralarındaki etkileşiminin etanol verimine etkisi araştırılmıştır. Çalışılan derişim aralıklarında Na'un en düşük ( $930 \text{ mgL}^{-1}$ ), Ca'un orta ( $1515 \text{ mgL}^{-1}$ ) ve Mg'un orta ( $128 \text{ mgL}^{-1}$ ) kodlanmış değerlerinde en yüksek etanol derişimine ulaşılmıştır. Na'un tek başına etkili olduğu, Mg ve Ca iyonlarının birbirini etkilediği sonucuna varılmıştır.

**Bilim Kodu** : 912.1.023  
**Anahtar Kelimeler** : Etanol fermentasyonu, Etanol Üretimi, Zeolit,  
*Saccharomyces cerevisiae*  
**Sayfa Adedi** : 119  
**Tez Yöneticisi** : Prof. Dr. Mübeccel ERGUN

**THE INFLUENCE OF MATERIALS ADDED TO FERMANTATION  
MEDIUM ON ETHANOL PRODUCTION**

**(M.Sc. Thesis)**

**GAZI UNIVERSITY  
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

**September 2007**

**ABSTRACT**

The production of ethanol with the method of fermentation has gained great impetus due to advancement in technology, the rapid increase in the world population, the run out of petroleum fuels reserves in crust of earth, the repercussions of the skyrocketing of costs in national economy and protection and use of the national resources. That is why, the determination of conditions that will increase the output efficiency of ethanol is necessary for reproduction and development of microorganisms and the efforts being made on this subject have great importance. The purpose of this study is to investigate the effects of materials added to fermentation medium that is created by *Saccharomyces cerevisiae*, on ethanol production, ethanol concentration, production rate and pH. The study is executed in three steps. In the first step NaY, MNT and KLN are added to medium with an initial pH value of 4,5. Under these circumstances, adding 15 gL<sup>-1</sup> NaY to fermentation medium containing 200 gL<sup>-1</sup> sugar, production rate increased. When the medium contains 10 gL<sup>-1</sup> MNT, the ethanol concentration reached to maximum value in the existence of 200 gL<sup>-1</sup> sugar, on the otherhand the time required to reach to maximum concentration is decreased. The ethanol production rate is increased by 16 percent. The presence of 5 gL<sup>-1</sup> KLN did not have any influence on ethanol concentration, but the production rate is raised resulting in approximately %50. In the second stage, active carbon, bentonite and talk are inserted into fermentation medium. The

experiments were made with a fermentation medium which contains  $100 \text{ gL}^{-1}$  sugar. Presence of  $10 \text{ gL}^{-1}$  bentonite, yield increased %6, when  $10 \text{ gL}^{-1}$  active carbon exists time that was required for reaching to maximum yield decreased. The supplementation of talk adversely affected the fermentation. In the third stage, we investigated the effect of change of Na, Ca and Mg ions on ethanol yield. The maximum ethanol concentration level was reached at the lowest Na concentration, the middle Ca concentration and the middle Mg concentration for the coded values of  $931 \text{ mgL}^{-1}$ ,  $1515 \text{ mgL}^{-1}$ ,  $128 \text{ mgL}^{-1}$  respectively.

**Science Code** : 912.1.023  
**Key Words** : Ethanol Fermentation, Ethanol Production, Zeolite, *Saccharomyces cerevisiae*  
**Page Numbers** : 119  
**Adviser** : Prof. Dr. Mübeccel ERGUN

## TEŞEKKÜR

Tez çalıŐmalarım sırasında bilgi ve deneyimleriyle bana her konuda yardımcı olan danıŐman Hocam Prof. Dr. MÜBECCEL ERGUN'a saygı ve teŐekkürlerimi sunarım. Her türlü sorunda beni yönlendiren, çalıŐmalarımın sonuçlanmasında hiçbir yardımı benden esirgemeyen çok sevgili hocam Dr. AyŐe TOSUN'a teşekkür ederim. Yardım ve katkılarından dolayı Eskişehir Alkol Fabrikası İŞletme Müdürü sayın Dr. Kamil AYA'ya teşekkür ederim. Hayatım boyunca maddi ve manevi her türlü konuda yanımda olan ve beni destekleyen çok sevgili babam, annem ve kardeŐlerime teşekkür ederim.



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR .....	viii
İÇİNDEKİLER .....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ .....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE LİTERATÜR ARAŞTIRMASI .....	3
2.1. Lignoselülozik Maddeler.....	3
2.1.1.Melas.....	4
2.2. Fermentasyon Teknolojisi.....	6
2.3. Glikoliz.....	7
2.4. Fermentasyon .....	10
2.5. Etanol.....	11
2.5.1.Etanolün kullanım alanları.....	13
2.5.2.Etanol metabolizması.....	15
2.6. Fermentasyonda kullanılan mikroorganizmalar.....	16
2.6.1. Mayalar hakkında teknolojik bilgiler.....	17
2.6.2. Mayaların bileşimi ve fizyolojik yapısı.....	19
2.6.3. Mayaların bileşimi .....	20
2.6.4. Mayaların beslenmesi.....	21

**Sayfa**

2.6.5. Mayaların gelişmesini ve fermentasyon performanslarını etkileyen etmenler .....	24
2.7. Kesikli Reaktör Fermentasyon Kinetiği.....	31
2.7.1. Mikroorganizmaların üreme kinetiği .....	32
2.7.2. Mikroorganizmaların yaşam evreleri.....	32
2.8. Metal İyonlarının Maya ve Etanol Fermentasyonu Üzerindeki Rolü .....	37
2.9. Fermentasyon Ortamına Eklenen Maddelerin Etanol Üretimi Üzerine Etkileri .....	42
2.9.1. Zeolitler.....	42
2.9.2. Killer.....	45
2.9.3. Vitaminler.....	47
2.9.4. Adsorbanlar.....	47
2.10. Deneysel tasarım yöntemleri.....	49
2.10.1. Box-Wilson tasarımı.....	49
2.10.2. Hipotez testi.....	53
2.10.3. Cevap yüzeyi metodu.....	54
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	56
3.1. Kültürleme.....	56
3.2. Mikroorganizma ve Hazırlanışı.....	56
3.3. Önaktifleştirme ve Üreme Ortamının Hazırlanışı.....	57
3.4. Üreme Eğrisinin Elde Edilmesi.....	57
3.5. Mikroorganizma Kuru Hücre Ağırlığının Belirlenmesi.....	58
3.6. Etanol Analizi.....	58

	<b>Sayfa</b>
3.6.1. Etanol analizinde kullanılan belirteçler.....	58
3.6.2. Etanol Analizinin Yapılışı.....	60
4. DENEY SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	61
4.1. Üreme Eğrisinin Oluşturulması.....	61
4.2. Kuru Hücre Ağırlığı Tayini Sonuçları.....	62
4.3. Ön Deneyle İle Uygun Fermentasyon Ortamının Belirlenmesi.....	63
4.4. Şeker derişiminin belirlenmesi.....	64
4.5. Fermentasyon ortamına NaY eklenmesi.....	66
4.5.1. NaY'nin etanol ortamına etkisi.....	66
4.5.2. NaY'nin ortamın pH değişimine etkisi.....	69
4.6. Fermentasyon Ortamına Montmorillonit Eklenmesi.....	71
4.6.1. MNT'nin etanol üretimine etkisi.....	72
4.6.2. MNT'nin ortamın pH değişimine etkisi.....	75
4.7. Fermentasyon Ortamına KLN Eklenmesi.....	76
4.7.1. KLN'nin etanol üretimine etkisi.....	77
4.7.2. KLN'nin ortamın pH değişimine etkisi.....	80
4.8. Yapay Melas Ortamına Eklenen Maddeler.....	82
4.9. Fermentasyon Ortamına Bentonit Eklenmesi.....	82
4.9.1. Bentonitin etanol üretimine etkisi.....	83
4.9.2. Bentonitin ortamın pH değişimine etkisi.....	85

**Sayfa**

4.10.Fermentasyon Ortamına Aktif Karbon Eklenmesi.....	86
4.10.1. Aktif karbonun etanol üretimine etkisi.....	86
4.10.2. Aktif karbonun ortamın pH değişimine etkisi.....	88
4.11. Fermentasyon Ortamına Talk Eklenmesi.....	88
4.11.1. Talk'un etanol üretimine etkisi.....	89
4.12. Farklı Metal İyonu Derişimlerinin Etanol Verimi Üzerine Etkisi.....	90
4.12.1. Box-Wilson deneysel tasarım yönteminden yararlanarak fermentasyon ortamına Ca,Na ve Mg iyonlarının etkisinin araştırılması.....	91
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	100
KAYNAKLAR.....	102
EKLER .....	106
EK-1 Logaritmik büyüme eğrisi için kullanılan veriler.....	107
EK-2 NaY'nin değişen derişimlerinde elde edilen veriler.....	108
EK-3 MNT'nin değişen derişimlerinde elde edilen değerler.....	110
EK-4 KLN'nin değişen derişimlerinde elde edilen değerler.....	112
EK-5 Bentonitin değişen derişimlerinde elde edilen değerler.....	114
EK-6 Aktif karbonun değişen derişimlerinde elde edilen değerler.....	115
EK-7 Talk'un değişen derişimlerinde elde edilen değerler.....	116
EK-8 1999 Yılı kampanya ortalaması melas analizlerinden alınan değerler.....	117
EK-9 Deneysel ve bilgisayar programında hesaplanan EYED grafiği.....	118
ÖZGEÇMİŞ.....	119

## ÇİZELGELER LİSTESİ

<b>Çizelge</b>	<b>Sayfa</b>
Çizelge 2.1. Fermentasyon teknolojisiyle üretilen maddeler.....	7
Çizelge 2.2. Genel olarak tüm mayaların bileşimi.....	21
Çizelge 2.3. Bazı zeolitlerin iyon değiştirme kapasiteleri.....	44
Çizelge 2.4. Üç faktörlü tasarım için plan matrisi.....	51
Çizelge 2.5. Anova testinde kullanılan değerler.....	52
Çizelge 4.1. Farklı şeker derişimlerinde kullanılan optimum fermentasyon ortamı.....	65
Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan NaY'nin içeriği.....	66
Çizelge 4.3. 300gL <sup>-1</sup> sakkaroz içeren fermentasyon ortamına NaY'nin değişen miktarlarda eklenmesiyle elde edilen sonuçlar.....	67
Çizelge 4.4. NaY'nin 200gL <sup>-1</sup> şeker içeren fermentasyon ortamına eklenmesiyle elde edilen sonuçlar.....	68
Çizelge 4.5. MNT'nin kimyasal içeriği.....	71
Çizelge 4.6. 300gL <sup>-1</sup> şeker içeren ortamına MNT'nin ortamına eklenmesiyle elde edilen sonuçlar.....	73
Çizelge 4.7. 200gL <sup>-1</sup> şeker içeren fermentasyon ortamına 10gL <sup>-1</sup> MNT eklenmesi ile elde edilen sonuçlar.....	74
Çizelge 4.8. 300gL <sup>-1</sup> sakkaroz içeren fermentasyon ortamına KLN'nin değişen miktarlarının eklenmesi ile elde edilensuçlar.....	78
Çizelge 4.9. 200gL <sup>-1</sup> şeker içeren fermentasyon ortamına 5gL <sup>-1</sup> KLN ilavesiyle elde edilen sonuçlar.....	79
Çizelge 4.10. Çalışmada kullanılan yapay melas ortamı.....	84
Çizelge 4.11. 100 gL <sup>-1</sup> şeker içeren fermentasyon ortamına değişik derişimlerde bentonit eklenmesiyle elde edilen sonuçlar.....	84
Çizelge 4.12. Aktif karbonun değişen derişimlerinin fermentasyon ortamına eklenmesi ile elde edilen sonuçlar.....	87

<b>Çizelge</b>	<b>Sayfa</b>
Çizelge 4.13. Talk'un değişen derişimlerinin fermentasyon ortamına eklenmesi ile elde edilen sonuçlar.....	89
Çizelge 4.14. Plan matrisindeki bağımsız değişkenlerin gerçek değerleri.....	92
Çizelge 4.15. Parametrelerin kodlanmış ve gerçek değerleri.....	93
Çizelge 4.16. Deneysel ve modelden hesaplanan etanol verimleri.....	94
Çizelge 4.17. Quadratic model için bulunan denklem katsayıları.....	95
Çizelge 4.18. Modifiye Quadratic model için bulunan denklem katsayıları .....	96

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Bitki hücre duvarı.....	3
Şekil 2.2. Glikozun pürivata kadar parçalandığı süreç.....	9
Şekil 2.3. Etanol fermentasyonu oluşum süreci.....	11
Şekil 2.4. Etanol metabolizması.....	16
Şekil 2.5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'nin SEM görüntüsü.....	18
Şekil 2.6. Maya hücresi.....	19
Şekil 2.7. Çözelti derişiminin maya aktivite hızına etkisi.....	26
Şekil 2.8. Enzim derişimi-reaksiyon hızı eğrisi.....	27
Şekil 2.9. Mikroorganizmaların yaşam evreleri.....	33
Şekil 2.10. Beklenen verimin $X_1$ ve $X_2$ 'nin fonksiyonu olarak üç boyutlu gösterimi.....	54
Şekil 2.11. Cevap yüzeyi için kontur plot eğrisi .....	55
Şekil 4.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mayası için üreme eğrisi.....	61
Şekil 4.2. Absorbans-Kuru hücre ağırlığı kalibrasyon eğrisi.....	62
Şekil 4.3. NaY'nin $300 \text{ gL}^{-1}$ şeker içeren fermentasyon ortamına eklenmesiyle elde edilen etanol derişimi- süre eğrileri .....	67
Şekil 4.4. $15 \text{ gL}^{-1}$ NaY'nin $200 \text{ gL}^{-1}$ şeker içeren fermentasyon ortamına eklenmesiyle elde edilen etanol derişimi –süre eğrileri.....	69
Şekil 4.5. $300 \text{ gL}^{-1}$ şeker varlığında NaY içeren ortamlarda pH- süre eğrileri.....	70
Şekil 4.6. $200 \text{ gL}^{-1}$ şeker içeren fermentasyon ortamında $15 \text{ gL}^{-1}$ NaY varlığında pH-süre eğrileri.....	71
Şekil 4.7. $10 \text{ gL}^{-1}$ MNT'nin $300 \text{ gL}^{-1}$ fermentasyon ortamına eklenmesiyle elde edilen etanol derişimi-süre eğrileri.....	73

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 4.8. 200 gL <sup>-1</sup> şeker içeren fermentasyon ortamına 10 gL <sup>-1</sup> MNT'nin eklenmesiyle elde edilen etanol derişimi- süre eğrileri.....	74
Şekil 4.9. 300 gL <sup>-1</sup> şeker içeren fermentasyon ortamına MNT eklenmesiyle elde edilen pH- süre grafiği.....	75
Şekil 4.10. 200 gL <sup>-1</sup> şeker içeren fermentasyon ortamına MNT eklenmesiyle elde edilen pH- süre grafiği.....	76
Şekil 4.11. 300 gL <sup>-1</sup> şeker varlığında KLN'nin elde edilen etanol derişimi- süre eğrileri.....	78
Şekil 4.12. 200 gL <sup>-1</sup> şeker içeren fermentasyon ortamına 5 gL <sup>-1</sup> KLN ilavesiyle elde edilen etanol derişimi- süre eğrileri.....	80
Şekil 4.13.300 gL <sup>-1</sup> şeker içeren ortamda KLN ilavesiyle elde edilen pH değişimi- süre grafiği.....	81
Şekil 4.14. 200 gL <sup>-1</sup> şeker içeren ortamda 5 gL <sup>-1</sup> KLN ilavesiyle elde edilen pH değişimi- süre grafiği.....	81
Şekil 4.15. Değişen bentonit miktarlarının etanol verimine etkisi.....	85
Şekil 4.16. Değişen bentonit miktarlarının pH üzerine etkisi.....	86
Şekil 4.17. Değişen aktif karbon derişimlerinin fermentasyon ortamına eklenmesiyle elde edilen etanol derişimi-süre eğrileri.....	88
Şekil 4.18. Değişen talk derişimlerinin fermentasyon ortamına eklenmesiyle elde edilen etanol derişimi - süre eğrileri.....	90
Şekil 4.19. Mg derişiminin optimum değerinde Y'nin, Na, ve Ca'un fonksiyonu olarak üç boyutlu gösterimi.....	97
Şekil 4.20. Na derişiminin optimum değerinde Y'nin, Mg, ve Ca'un fonksiyonu olarak üç boyutlu gösterimi.....	98
Şekil 4.21. Ca derişiminin optimum değerinde Y'nin, Na, ve Mg'un fonksiyonu olarak üç boyutlu gösterimi.....	99



## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada bazı simgeler ve kısaltmalar açıklamalarıyla birlikte aşağıda sunulmuştur.

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
$\mu$	Biyokütle için spesifik üreme hızı
$x$	Biyokütle derişimi
$t$	Zaman
$dx/dt$	Üreme hızı
$\mu_d$	Spesifik ölüm hızı sabiti
$X_{max}$	Durağan faz biyokütle derişimi
$R^2$	Korelasyon katsayısı
$U_i$	Parametrelerin kodlaştırılmış değeri
$X_{io}$	Parametrelerin ortalama değeri
$X_i$	Parametrelerin gerçek değeri
$\Delta X_i$	Parametrelerin adım aralığı
$X_1, X_2, X_3$	Model terimleri
$T$	Sıcaklık
$Y$	Etanol derişimi
$X_{gL}$	Kuru hücre ağırlığı
$V$	Fermentasyon ortamının hacmi
$B_0, \dots, b_n$	Model katsayıları
$F$	Serbestlik derecesi

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfat
<b>ADP</b>	Adenosin difosfat
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>KLN</b>	Klinoptilolit
<b>EYED</b>	En yüksek etanol derişimi

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
<b>MNT</b>	Montmorillonit
<b>MSM</b>	Model karelerinin oranı
<b>MSE</b>	Hata karelerinin oranı
<b>NAD</b>	Nikotin amid dinukleotid
<b>PGAL</b>	Fosfo gliser aldehit
<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>SEM</b>	Taramalı elektron mikroskobu
<b>SSE</b>	Hata karelerinin toplamı
<b>SSM</b>	Model karelerinin toplamı
<b>SST</b>	Toplam hata karelerinin toplamı

## 1. GİRİŞ

Gelişen teknoloji, artan dünya nüfusu, azalan petrol rezervleri ve maliyetin yükselmesiyle ülke ekonomisine doğrudan ve büyük katkı sağlaması ve ulusal kaynakların korunması ve değerlendirilmesi açısından fermentasyonla alkol üretimi güncellik kazanmıştır.

Fosil kökenli enerji kaynaklarının birçoğu hesaplanan yaklaşık bir süre sonunda tükenecektir. Bu tür kaynaklar çevre için önemli ve geri dönüşümü olmayan tehlikeler yaratmaktadır. Ayrıca artan ihtiyacı ve gelişen teknolojiyi beslemekte yetersiz kalmaktadır. Gelişmiş ülkeler enerji çeşitliliğini artırmakta, yaymakta ve belli enerji kaynağı türlerine büyük oranlarda bağımlı olmamaya çalışarak alternatif arayışlarını sürdürmektedirler. Diğer yandan, yeni veya yenilenebilir enerji kaynaklarının çeşitliliği artmaktadır. Bir kısmı ekonomik alternatiflik açısından değer kazanmakta, ancak, tamamının ortak yönü çevreye olumsuz etkilerinin olmamasıdır. Biyoyakıtlar en yeni ve hızla yaygınlaşan alternatiflerin en başında gelenidir. 1992 yılında piyasaya sunulan biyoyakıtlar çok hızlı bir şekilde gelişmektedir. Biyoyakıtlar; fosil kökenli yakıt rezervlerinin (petrol, kömür, doğalgaz v.b.) dünyanın belirli bölgelerinde bulunması, tükenme riski ve yaygın kullanımın çevreye olan olumsuz etkilerinin gündeme getirdiği, daha çok tarımsal ürünlerden, değişik kimyasal yöntemler yardımıyla üretilen benzin ve motorinle karışım halinde kullanılan, temiz enerjilerden biridir. Biyoyakıtların gündeme bu kadar gelmesinin birçok nedeni vardır; çevreyle dost olmaları, egsoz emisyonlarının sağlık açısından riskinin az olması, enerji güvenliğinin sağlanması ve dışa bağımlılığın azaltılması, kırsal kalkınmanın gerçekleştirilmesi gibi nedenleri örnek verebiliriz.

Biyooetanol, kökeni nişasta olan ve tarım ürünlerinden elde edilen oktan sayısı yüksek bir biyoyakıttır. Biyooetanol, tarım ürünlerinde var olan nişastanın şekere dönüşümünden sonra uygulanan fermantasyon işlemi sonucu ortaya çıkar. Benzinle doğrudan karışabilir. Biyooetanol üretilebilecek başlıca bitkiler: Buğday, şeker pancarı, mısırdır. Yapılan araştırmalar en ekonomik biyooetanolün şekerpancarı, mısırdır.

ve buğdaydan üretildiğini göstermektedir. Ülkemizde biyoetanol, ağırlıklı olarak şeker fabrikalarında melastan üretilmektedir. Biyoetanol üretiminin artırılabilmesi için hammadde üretim miktarlarının artırılması gerekir.

Şeker pancarı melası, kaliteli, kolay bulunabilen, ucuz karbon kaynağı olan lignosellülozik biyokütlelerin başında gelir. Fermentasyon teknolojisinde, kullanılan ana materyallerden biri de mikroorganizmadır. Fermentasyonda mikroorganizma biyokataliz olarak kullanılır. *Saccharomyces cerevisiae*, biyokimyasal dönüşüm proseslerinde, biyokatalist olarak yaygın bir şekilde kullanılır ve uygun koşullar altında melastan etanol üretimine elverişlidir.

Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş.'nin etil alkol üretimine yönelik 4 tesisi bulunmaktadır. Ancak, bilimsel araştırmaların eksikliği nedeniyle, şeker endüstrisinin yan ürünü olan melastan etanol üretiminin ekonomik geçerliliği tartışılır durumdadır. Bu yüzden bu 4 fabrikadan sadece bir tanesi çalışır durumdadır.

Fermentasyon, 250 mL'lik erlenlerde, sallamalı su banyosunda, 30 °C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Elde edilen etanol analitik yöntemlerle, biyokütle miktarı spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir.

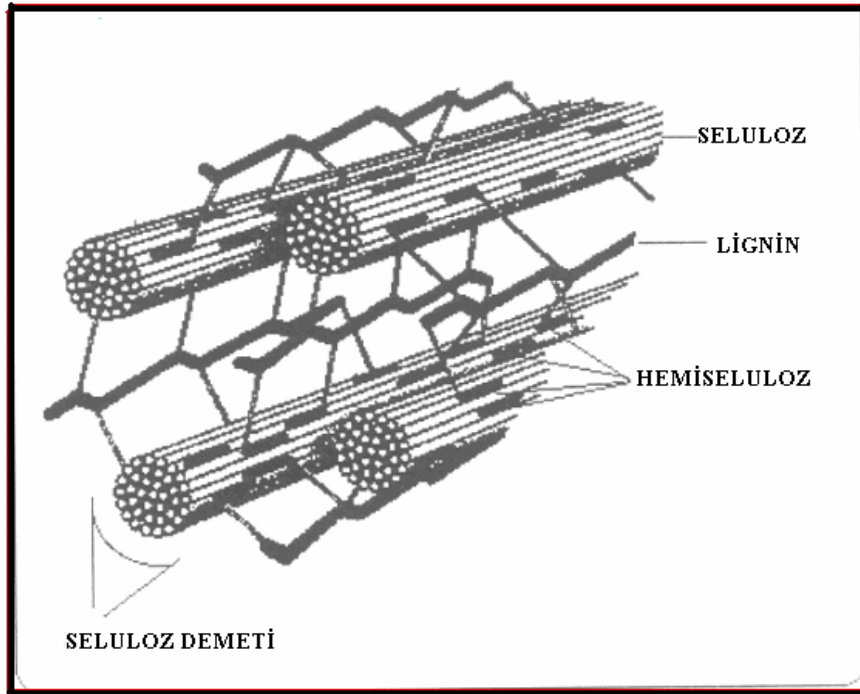
Çalışmanın ilk aşamasında, iyon değişimi, katalitik ve adsorpsiyon özellikleri ile son zamanlarda biyokimyasal çalışmalarda gündeme gelen zeolitlerden yapay zeolit NaY, doğal zeolit KLN, kil maddesi MNT'nin değişen derişimleri eklenerek deneyler yapılmıştır. Çalışmanın ikinci kısmında yine bir montmorillonit çeşidi olan Bentonit, kil maddesi Talk ve bir adsorban olan Aktif karbon kullanılmıştır. Bu maddelerin, fermentasyon boyunca, pH değişimi, etanol üretimi, üretim hızı üzerindeki etkileri üzerinde durulmuştur. Çalışmanın üçüncü bölümünde, Box-Wilson deneysel tasarım yönteminden yararlanılarak Na, Ca ve Mg iyonlarının birbirleriyle etkileşimlerinin etanol verimine etkisi incelenmiş, elde edilen sonuçların Design Expert 7.0 isimli bilgisayar programı yardımıyla istatistiksel analizleri yapılmıştır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER VE LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

### 2.1. Lignoselülozik Maddeler

Mayaların gelişme ve çoğalmaları için başta su olmak üzere çeşitli karbon ve azot maddeleri ve mineral maddeler gereklidir. Bunları içeren besin maddelerinden biri olan lignoselülozik bitki artıklarının yapısı Şekil 2.1'de gösterildiği gibidir.

Lignoselülozik doğal kaynakların bileşiminde %40-50 oranında en fazla yenilenen karbon kaynağı selüloz (beta glikoz polimeri) vardır. Diğer bileşenler ise ağırlıkça %20-25 lignin (değişik şekillerde bağlanmış fenil propan birimleri), %20-25 hemiselüloz (pentozların, heksozların ve üranik asitlerin polimeri), özütlenbilir maddeler ve inorganik maddelerdir.



Şekil 2.1. Bitki hücre duvarı

Fermentasyon teknolojisinde kullanılan en önemli lignosellülozik maddelerden biri de melastır.

### **2.1.1. Melas**

Melas, şeker üretiminde teknik ve ekonomik şartlar altında şuruplardan kristal şeker alındıktan sonra geriye kalan şuruptur. İçeriği pancar çeşidine, yetiştirildiği toprağa ve iklim şartlarına göre değişiklik gösterir. Melasın % 45-50'sini toplam şeker oluşturur. Sakkarozun kazanılması ise ya şeker dışı maddelerin ortamdaki uzaklaştırılması ile şeker içeriği içeren temiz çözeltinin geride kalması ya da sakkarozun toprak alkali metallerle zor çözünen bileşikler vermesinden yararlanılarak sakkarozun ortamdaki arındırılması ile sağlanır. Şeker dışı maddeler organik ve inorganik maddeleri ihtiva eder. Melasın 23'ü azotlu pektin ile hemiselülozun oluşturduğu azotsuz organik maddeler, %12'sini potasyum, sodyum, demir gibi mineral maddelerin bileşimi organik maddeler, %15'ini de su oluşturur. pH değeri 5,5 ile 10 arasındadır.

Alkol üretiminde birim maliyete etki eden faktörlerden en önemlisi hammadde olduğundan, melas gibi kaliteli, kolay bulunabilen, ucuz karbon kaynağı olan maddeler esas alınmalıdır. Ayrıca melasa mikroorganizmanın gelişimi ve fermentasyon aktivitesi için zorunlu olarak dışarıdan ilave edilmesi gerekli madde olmaması açısından da fermentasyon yöntemi ile etanol üretiminde en yaygın kullanılan hammaddedir. Örneğin, melas mikroorganizmanın yaşamsal faaliyetlerini sürdürmeleri ve fermentasyon aktiviteleri için gerekli azot kaynakları, metal iyonları (çinko, mangan, magnezyum vb.) içeren organik maddeleri ve vitaminleri (biyotin, pantotenik asit, inosit vb.) içermektedir. Melasın fermentasyon teknolojisinde hammadde olarak kullanımının bir avantajı da diğer selülozik maddeler (mısır sapı, fındık kabuğu vb.) gibi hidroliz edilmesine gerek olmayışıdır. Mikroorganizma melasın içindeki sakkarozu, enzimleri sayesinde glikoz ve fruktoza dönüştürür ve fermentasyonu gerçekleştirir.

Melas, alkol üretimi yanında çeşitli mikroorganizmalar kullanılarak aerobik ve anaerobik fermentasyonla sitrik asit, asetik asit, maya, antibiyotik gibi birçok maddenin üretiminde hammadde olarak da kullanılmaktadır. Ayrıca pancar küspesine katılarak hayvan yemi olarak değerlendirilir ve bazı endüstri dallarında bağlayıcı ajan olarak da kullanılmaktadır.

Melasın yapısının oldukça karmaşık oluşu ve pek çok madde içermesi etanol üretimini doğrudan etkilemektedir. Şeker dışı maddeler, hücre gelişimini ve fermentasyon aktivitesini sağlayan maddelerdir, ancak yüksek derişimlerde bulunmaları durumunda mikroorganizma üzerinde zehirleyici etkiye neden olabilmektedir.

Şeker fabrikalarında üretim sırasında, melasın polarizasyon, brix, kül ve invert şeker gibi özelliklerinin analizleri yapılarak kalitesi kontrol edilir. Melası hammadde olarak kullanan endüstriler, melasın toplam invert şeker miktarı, rafinoz ve kestoz, katı madde, sülfat külü, kükürtlü ve azotlu bileşikler, fermentasyon verimi, maya ve alkol verimi ve vizkozite gibi özelliklerinin bir veya birkaçını ürün çeşitlerine göre kalite faktörü olarak değerlendirirler.

Normal bir melasın içerdiği maddeler aşağıda verilmiştir [1].

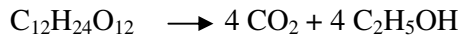
Kuru madde, Bx, %	: 85
Polar şeker, % P	: 50
Arılık, Q	: 58,8
Şeker dışı madde/100 Bx	: 41,2
Azotlu şeker dışı madde	: 14,0
Azotsuz şeker dışı madde	: 16,0
Kül, %	: 11,2

Azotlu şeker dışı maddeler içinde en fazla miktarda bulunan ( $\approx$  %5) betaindir, sonra glutamin ve hidroliz ürünleri, prolidon karbon asidi ve glutamik asit gelir. Diğer aminoasitlerde önemli bir miktar oluşturur. Bunların yanında purin, primidin bazları ve inorganik azot cinsleri nitrat ve nitrit bulunur.

Azotsuz şeker dışı maddelerin büyük bir kısmı invert şeker, rafinoz ve kestozdur. Rafinoz miktarı kampanyada (şeker fabrikalarında şeker üretilen dönem) %5 iken, kampanya sonunda özellikle silolanmış pancarlardan elde edilen melasta % 2 ye kadar çıkar. Kestoz miktarı ise pancarın silolanması sırasında ve fabrikasyonda mikroorganizmaların etkisi ile miktarı gittikçe artarak kampanya sonunda melasta % 2- 3'e ulaşır.

## 2.2. Fermentasyon Teknolojisi

Başlangıcı çok eskilere dayanan öyle ki Milattan 2500 yıl öncelerinde Mısırlıların bira yapımında kullandıkları, fermentasyonun ilk adımları, 1789 yılında Lavosier tarafından atılmış, 1815 yılında Gay Lusac tarafından formüle edilmiştir.



Dums ve Bullay ise daha sonra bu Gay Lusac formülünü;



olarak düzenlemişlerdir.

Fermentasyon 1839 yılında da Alman kimyager Liebig tarafından mekanik bir parçalanma olarak tanımlanmıştır. Pasteur ise 1857 yılında fermentasyonun maya tarafından gerçekleştirilen fizyolojik ve biyolojik bir olay olduğunu ispatlamıştır. Günümüzde bu teknoloji ile antibiyotik, vitamin, amino ve nükleik asitler ve biogaz, etanol gibi yakıtlar üretilmektedir. Bunların dışında atık suların mikropsal arıtılması gibi işlemler de fermentasyon teknolojisinin başka uygulamalarındandır.



Tarım ülkesi olan Türkiye’de fermentasyon sektörü biyoendüstrimizin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. 20 yılı aşan süreden beri fermentasyon teknolojisi ile üretim yapan kuruluşlarımız vardır. Ancak, bilimsel araştırmaların eksik olması nedeniyle eğitim ve üretimde daha çok yabancı araştırmacıların bulgularından yararlanılmış, üretimde etkin olan kısımlar belirsiz kalmıştır.

Çizelge 2.1. Fermentasyon teknolojisi ile üretilen maddeler

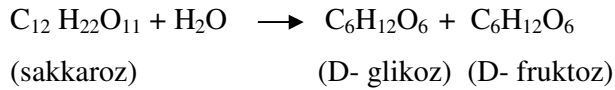
Yiyecek & içecekler	Endüstriyel	Farmosötik	Vitaminler	Enzimler
* Bira	* Asetik asit	* Basitrasin	* Ergosterol	*Amilaz
*EkMEK	* Aseton	* Kandisisin	* Riboflavin	* Selülaz
*Peynir	* Aspartik asit	* Nistatin	* Vitamin A	* Diestaz
*Kakao	* Tartarik asit	*Mitomisin C	* Vitamin B <sub>2</sub>	* İntervaz
*Kahve	* Süksinik asit	* Penisilin	*Vitamin B <sub>12</sub>	* Maltaz
*Koji	* İtokonik asit	* Polimisin		* Zimaz
*Çay	* Lizin	* Tetrasiklin		
*Sirke	* Vanilin	*Streptomisin		
*Şarap	* Fuzel yağı	* Vankomisin		

### 2.3. Glikoliz

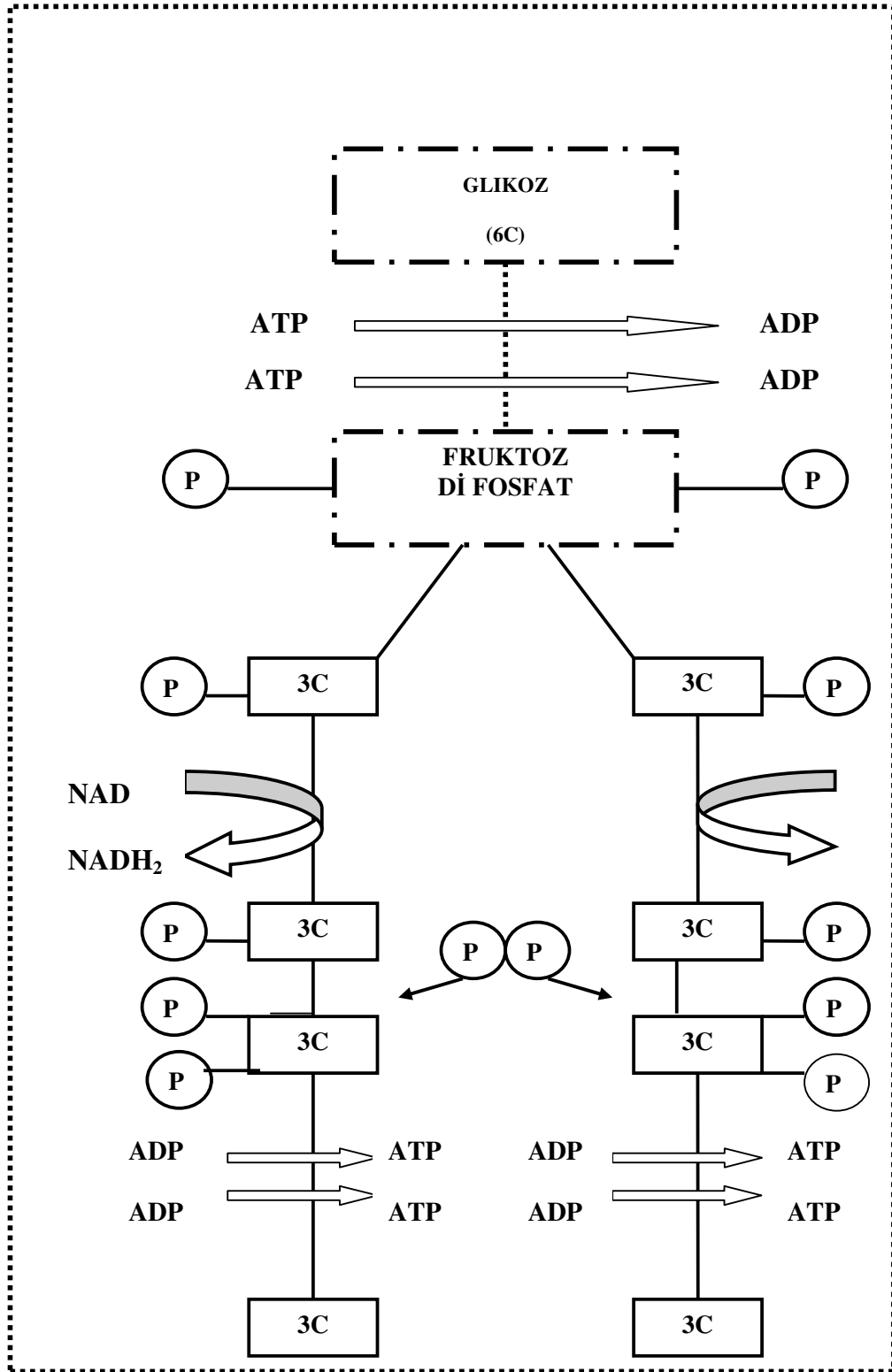
Canlılar yaşamlarını devam ettirebilmek için sürekli enerji elde etmek zorundadır. Enerjiyi de ancak besin maddelerini yakarak yani daha küçük moleküllere parçalayarak elde ederler. Canlıların besin maddelerini yakarak onlardan enerji elde etmelerine solunum denir. Bazı canlılar hücrelerinde bulunan yapılar sayesinde ortamda da oksijen varsa besinleri CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O’ya kadar yakabilirler. Oksijen kullanmayan canlılar ise glikoz molekülünü ancak pürivata kadar yakabilirler.

Pürivat molekülü henüz tam olarak yakılmadığından bağları arasında hala enerji vardır. Bu yüzden pürivata kadar yakabilen canlılar yani oksijen kullanamayan canlılar 1 mol glikozdan daha az enerji elde ederler. Buradan çıkan sonuç şudur; bazı canlılar besinlerin yıkılmasında oksijen kullanırlar, yani oksijenli solunum yaparlar. Bazıları ise oksijen kullanamaz ya da yeterli oksijen bulamaz, yani oksijensiz solunum yaparlar. Canlılar ister oksijenli ister oksijensiz solunum yapsın başlangıç reaksiyonları hücrenin stoplazmasında gerçekleşir ve hep aynıdır. Bu reaksiyon dizisine glikoliz denir.

Maya hücreleri salgıladıkları invertaz enzimi yardımıyla ortamdaki sakkarozu D-glikoz ve D- fruktoza dönüştürürler.



Bu reaksiyon dizini enzimlerin yardımıyla ve ortamda yeterli enerji var ise başlayabilir. Bu enerji aktivasyon enerjisi olarak kullanılan enerjidir. Glikozun parçalanmaya başlaması için yani glikoliz reaksiyonlarının başlaması için stoplazmada bulunan 2 ATP ( Adenozin trifosfat)'nin harcanması gerekir. Glikoz molekülü ile tepkimeye giren ATP molekülleri son fosfatlarını glikoza vererek tepkimeden ADP (Adenozin difosfat) olarak ayrılır. Bu arada glikoz da fruktoza dönüşür. Aktifleşmiş molekül fruktoz difosfattır. İkiye ayrılan 6 C'lu 2 P'li molekülden 2 tane PGAL (Fosfogliser aldehit) oluşur. Bundan sonra reaksiyon iki PGAL üzerinden yani iki koldan devam eder. PGAL ortamda bulunan NAD (Nikotin amid dinükleotid) ile reaksiyona girerek bir çift hidrojenini NAD'ya verir. NADH<sub>2</sub> oluşur. Bu arada PGAL'in bağlarında bir boşluk oluşur. Bu boşluk ortamda bulunan fosfat ile doldurulur ve 3 C'lu 2 P'li bir molekül oluşur. Bu molekül ortamda bulunan ADP'ler ile reaksiyona girerek sırasıyla 2 ATP oluşur. Geriye kalan molekül ise pürivat olarak adlandırılır. Diğer PGAL'de de aynı gelişmeler olacağı için toplam 4 ATP sentezlenmiş olur (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Glikozun pürivata kadar parçalandığı süreç

## 2.4. Fermentasyon

Fermentasyon (mayalanma), genellikle glikozun alkole dönüştüğü reaksiyonlar için kullanılan bir isimdir. Bu dönüştürme işi maya adı verilen tek hücreli canlıların stoplazmalarında gerçekleşir. Ancak fermentasyonun daha uygun bir tanımı, karbonhidratların alkol ve asitlere dönüştürülmesidir.

Fermentasyon işlemi pek çok farklı besin maddesinin üretiminde kullanılmaktadır. Yoğurt, boza, alkollü içkiler fermentasyon yoluyla üretilen pek çok besinden bazılarıdır.

Özel olarak fermentasyonla ilgilenen bilimin adı '*Zimoloji*' dir.

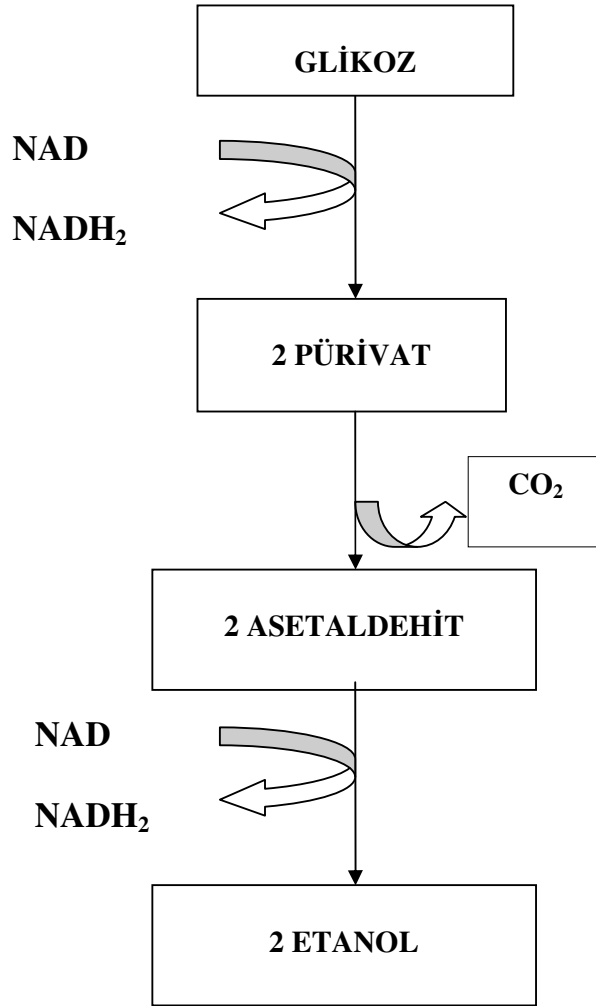
*Sembolle eşitliği:*



*Yazıyla:*

Şeker (glikoz) → Alkol + Karbondioksit + Enerji (ATP)

Hücre içine giren glikoz stoplazmada bir seri tepkimeye girerek (Şekil 2.2) pürivata dönüşür. Maya hücreleri oksijensiz solunum yapabildikleri için, pürivat kademesinden ancak biraz daha ileri bir parçalanmayı gerektirirler. Fermentasyonda son elektron alıcısı, oksijenin yerine hayvanlarda laktik asit, mayalarda etanol, bazı bakterilerde gliserol ya da sirke bakterilerinde asetik asittir. Maya hücrelerinde dekarboksile ( $CO_2$  çıkarılarak) edilerek asetaldehite dönüştürülür. Daha sonra asetaldehit etanole indirgenir. Gerekli enzimler olmadığı için hayvanlarda ve insanlarda asetaldehit ve etanol meydana gelmez. Şekil 2.3'de görülen bu oksijensiz solunuma 'Etanol Fermentasyonu' denir.



Şekil 2.3. Etanol fermentasyonu oluşum süreci

## 2.5. Etanol

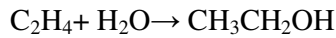
Etanol tarih öncesinden bu yana kadar insanlar tarafından, alkollü içkilerin içerisinde sarhoş edici katkı maddesi olarak kullanılmıştır. Kuzey Çin'de, içerisinde kurumuş etanol bulunan 9000 yıl öncesinden kalma toprak kaplar, etanolün neolitik dönemde alkollü içki olarak kullanıldığının bir göstergesidir. İlk defa, saf bir bileşik olarak ayrıştırılması, damıtma tekniğini geliştiren islam kimyagerleri tarafından gerçekleştirilmiştir. El- Kindi (801- 873) açık bir şekilde şarabın nasıl damıtıldığını tariflemiştir. Etanolün suyla birleşerek azotrop oluşturması nedeniyle, sudan

damıtılması sonucunda % 94 etanol içeren bir ürün elde edilebilir. Saf etanol 1796 yılında Johann Tobias Lowitz tarafından, damıtılmış etanolün mangal kömürü ile filtre edilmesi sonucu elde edilmiştir. Nicolas- Theodore de Saussure ise etanolün kimyasal formülünü tespit etmiştir. 1858 yılında Archibald Scott Couper, etanolün kimyasal formülünü yayınlamıştır. Bu yayın, etanolü kimyasal yapılar içerisinde duyurulmuş ilk kimyasal bileşikler arasına sokmuştur [2].

İlk defa 1826 yılında, birbirlerinden bağımsız olarak İngiltere’de Henry Hennel ve Fransa’da S.G. Serullas tarafından sentetik olarak üretilmiştir. Michael Faraday, bugün endüstriyel etanolün sentezlenmesine benzer şekilde, 1828 yılında etilenin asit katalize hidrasyonu ile elde etmiştir [3].

Etanol, hem etilenin hidrasyonu sonucu petrokimyasal olarak, hem de şekerin maya ile fermente edilmesi suretiyle üretilebilir.

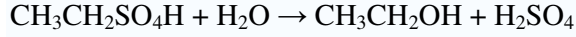
Etanol çoğunlukla petrokimyasal hammaddelerden etilenin asit- katalize hidrasyonu şeklinde elde edilir ve şu kimyasal denklem ile ifade edilir.



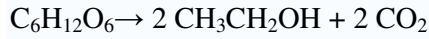
En yaygın katalist olan fosforik asit, diatomize toprak ya da mangal kömürü gibi gözenekli bir yüzeye emdirilir. Bu katalist ilk defa, 1947 yılında, geniş çaplı etanol üretimi amacıyla, Shell Oil Company tarafından kullanılmıştır [4]. Çoğunlukla metal oksitlerden oluşan katı katalistler de kimya kaynaklarında yer alırlar.

Daha eski bir yöntem, 1930 yılında, Union Carbide tarafından endüstriyel ölçekte denenmiş [5], fakat daha sonra tamamen terk edilmiştir. Etilen, konsantré sülfirik asit ile tepkimeye sokularak, etil sülfat elde edilir ve daha sonra hidrolize edilerek etanol ve tekrar sülfirik asit elde edilir:





Alkollü içeceklerde kullanılan etanol ile yakıt olarak kullanılan etanol, fermentasyon yöntemi ile elde edilir, bazı mayalar (en önemlisi, *Saccharomyces cerevisiae*), metabolize şeker oksijenin yokluğunda, etanol ve karbondioksit üretirler. Maya tarafından gerçekleştirilen kimyasal tepkimenin tamamı, şu kimyasal denklem ile ifade edilir.



Mayalanma ile, nispeten yoğun olmayan etanol derişimleri elde edilir. Konsantre etanol çözeltileri, maya için zehirleyicidir. Etanole en dayanıklı maya özü, hacimsel olarak, en fazla %25 etanolün içerisinde yaşayabilir.

Etanolün tahıl gibi nişastalı malzemelerden üretilebilmesi için, nişastanın önce parçalanarak şekere dönüşmesi gerekmektedir. Biranın mayalandırılmasında, bu geleneksel olarak, taneciklerin filizlendirilmesi sonucu ya da malttan elde edilir. Filizlenme prosesi sırasında tanecikler, nişastayı parçalayarak şekere dönüştürecek enzimler üretirler. Etanolün yakıt amaçlı üretilmesi sürecinde, nişastanın glikoza hidrolize olması, sulandırılmış sülfirik asit ve fungal amilaz enzimleri uygulaması ile çok daha hızlı gerçekleştirilir.

Petrol fiyatlarının bu kadar yükselmesi ile, saflaştırılmış etanol üretilmesi amacıyla etilen hidrasyonu, fermentasyondan daha ekonomik bir proses haline gelmiştir. Petrol fiyatlarındaki artışın, zirai ürün fiyatlarına da etkisinin olması, petro kimyasal etanol ile fermente edilmiş etanolün üretim maliyetlerini karşılaştırmayı güçleştirmektedir.

### 2.5.1. Etanolün kullanım alanları

- Başlangıçta yalnızca içki üretiminde kullanılan etanol, kimya sanayinde, suni ipek selüloz patlayıcı yapımında, boya ve lak üretiminde, çözücü ve çöktürme

maddesi olarak, eczacılıkta, parfümeride, sirke üretiminde ve konservatif madde olarak da kullanılır.

- Yüksek dereceli alkol mikroplar için kuvvetli zehir tesiri yapar ki bundan dolayı etanol antiseptik ve dezenfekte edici olarak kullanılır.
- Ayrıca etanol antrifriz yakıt ve içecek olarak da kullanılır.
- Etanolün enerji olarak kullanılmasının yararı ise, yenilebilir ve yerel kaynaklara dayalı olması ve tükenme sınırlarına yaklaşan petrolün yerine alternatif olmasıdır.

Etanolün motorlu taşıtlarda yakıt ve yakıt katkı maddesi olarak kullanılması fikri 1920'li yıllarda ortaya atılmıştır. Bilindiği gibi oktan sayısı otomobil yakıtlarının önemli bir özelliğidir. Süper benzinden daha yüksek oktan sayısına arttıracak, böylece benzine kurşun bileşiklerinin ilavesi gerekmeyecektir.

Fermentasyon yöntemi ile üretilen etanol sonucunda suda çözülmüş etanol elde edilir. Etanolün bir yakıt olarak kullanılabilmesi için suyun uzaklaştırılması gerekmektedir. En eski yöntem, basitçe damıtmaktır, fakat bu yöntemle, su etanol karışımı azeotrop oluşturduğu için %95-96 saflıktan öteye gitmek mümkün değildir. Çözelti karışımı damıtmayı sürdürerek, %96'dan daha saf etanol elde edilmesi mümkün değildir.

Benzinle karıştırılabilmek için, en az %95.5 ile %99.9 arasında bir saflığa ihtiyaç duyulmaktadır. En yaygın saflaştırma yöntemi, moleküler elek kullanarak fiziksel absorblama prosesidir.

Geçmişte, çiftçiler kendi etanollerini damıtırken, damıtım sürecinin bir parçası olarak ısı plakalarından yararlanırlarmış. Isı plakaları, çoğunlukla, etanolün içine karışabilen



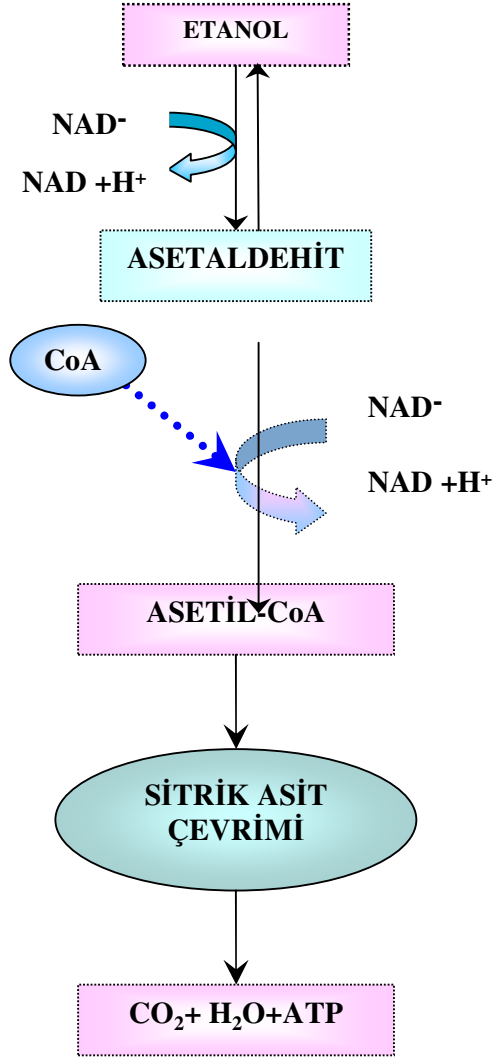
kurşun içerirlermiş. Bu şekilde kontamine olmuş yakıtın yakılması sonucu sinir sistemine zarar verebilen kurşun havaya karışmış. Bugün etanol yakıtı, özel olarak yetiştirilen bitkilerden, kurşun içermeyen yöntemlerle elde edilmektedir.

Genel olarak, bir benzin karışımındaki etanol miktarı yükseldikçe, standart araba motorları için uygunluğu azalmaktadır. Saf etanol kauçuk ve plastiklerle reaksiyona girdiği ya da onları çözdüğü için tadilat görmemiş motorlarda direk olarak kullanılamaz. Bu nedenle, en fazla yarar için, ateşleme zamanı ve sıkıştırma oranının değiştirilmesi gerekir. Saf benzin yakıtlı bir aracı, saf etanol yakıtlı bir araca dönüştürmek, alan olarak %30-40 kadar daha büyük karbüratör kullanımını gerektirir. Etanolla çalışan motorlar, 13 °C'nin altındaki sıcaklıklarda yanmayı maksimize edebilmek ve yanmamış, buharlaşmamış etanolü minimize edebilmek için, soğuk ortamda çalıştırma sistemine ihtiyaç duyarlar. Etanolün %10 ile %30 arasında bir karışımda kullanılması durumunda, hiçbir motor tadilatına ihtiyaç duyulmamaktadır. Pek çok yeni araç, bu oranlardaki karışımlarda güvenle çalışabilirler.

1999 yılından başlayarak, dünyada artan sayıda pek çok araç, tadilat gerektirmeksizin, %0 etanolden %85 etanole kadar çalışabilecek şekilde üretilmişlerdir. Pek çok hafif kamyon ve kamyonet , dual yakıt ya da esnek yakıtlı araç olarak üretilmektedir. Bu motorlar, yakıt cinsini otomatik olarak belirleyerek motor davranışlarını, temel olarak, silindirin içerisindeki hava yakıt karışımıyla ayarlarlar.

### **2.5.2. Etanol metabolizması**

Fermentasyon ortamında etanol derişimi en yüksek değere ulaştıktan sonra zamanla azalmaya başlar. Bunun anlamı maya hücrelerinin metabolik olarak enerji üretmek için etanolü de kullandığıdır. Ortamda oksijenin varlığında asetil koenzim A'yı meydana getirecek enzimler vardır ve sitrik asit çevrimi meydana gelir. Maya hücreleri etanolü kullanarak ATP sentezler. Etanol metabolizması Şekil 2.4.'de verilmiştir.



Şekil 2.4. Etanol metabolizması

## 2.6. Fermentasyonda Kullanılan Mikroorganizmalar

Bir çok organik maddenin elde edilışinde olduğu gibi etil alkolün elde edilışinde de mayaların büyük önemi vardır. Diğer yöntemlerle elde edilmesi zor olan organik maddeler, mayalar kullanılarak fermentasyon yolu ile kolayca elde edilirler. Bu nedenle etil alkol üretimi yapan fabrikalarda maya üretim üniteleri de bulunmaktadır.

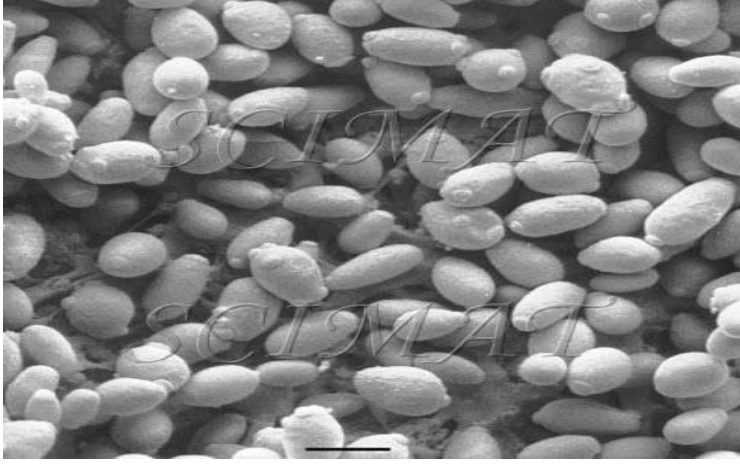
Fermentasyon teknolojisinde daha yüksek verim elde edilmesi, fermentasyon işleminin daha ekonomik olması ve çevre kirliliğine neden olmaması açısından fermentasyon için kullanılacak mikroorganizmaların belli özelliklere sahip olması gereklidir. Çok sayıda substratla kullanılabilme özelliğine sahip olması, kontaminasyondan arınmış olması, fermentasyon ortamından kolayca ayrılabilmesi, genetik değişikliğe dirençli olması, yüksek karbon-biyokütle dönüşümü sağlaması, geniş pH aralığında üreyebilmesi, son ürünün zehirleyici olmaması, yüksek oranda sindirilebilmesi, bitki, hayvan ve insanlar üzerinde patojen etkisinin olmaması gibi özelliklere sahip olmalıdır.

### **2.6.1. Mayalar hakkında teknolojik bilgiler**

Alkolic fermentasyonda en büyük rolü üstlenen mayalar; tek hücreli, spor yaparak veya tomurcuklanarak çoğalan 8-10 mikron ( $\mu$ ) büyüklüğünde bitkisel kökenli mikroskopik canlılardır. Mayalar doğada çok yaygındır. Toprakta özellikle de şeker ve karbonhidrat bakımından zengin olan besin maddelerinde bulunurlar. Üzüm ve meyve üzerinde yabani olarak yaşarlar, meyvelerin sıkılması ile öz suya geçerler, uygun şartlarda ürerler, ısıtmakla (kaynatmak, pastörize etmek) ölürler.

Tomurcuklanma ile çoğalmada, maya hücresinin uç tarafında bir şişkinlik meydana gelir. Bu şişkinlik giderek büyür ve bir tomurcuk şeklini alır. Uygun büyüklüğe gelince ana hücreden kopar. Bu hücre de aynı şekilde çoğalmaya devam eder.

Maya hücrelerini morfolojik olarak ayırt etmek zor olmasına rağmen kural olarak *Saccharomyces cerevisiae* genellikle yuvarlak veya eliptik bir şekil gösterir. (Şekil 2.5 ).



Şekil 2.5. *Saccharomyces cerevisiae*'nın SEM görüntüsü

*Saccharomyces cerevisiae* yumurta şeklinde, tek hücreli, uzun çapı 0,01 mm olan bir mayadır. Azot ve tuzlara ( $P_2O_5$ ,  $SO_2$ ,  $K_2O$ ,  $MgO$ ) ihtiyacı vardır. Bu nedenle saf şeker çözeltilerinde fermantasyon başlayabilir fakat devam etmez.

Maya hücreleri mikroskop altında incelendiğinde farklı şekillerde görülürler.

a. *Genç maya*: Sitoplazma içerisinde vakuol denen boşluklar ya çok küçük veya hiç yoksa bu tip mayalara genç maya denir.

b. *Olgun maya*: Hücreleri tek tek veya yumrulu gruplar halinde, vakuoller orta büyüklükte ve sitoplazma içerisindeki tanecikleri fazla olan mayalara denir.

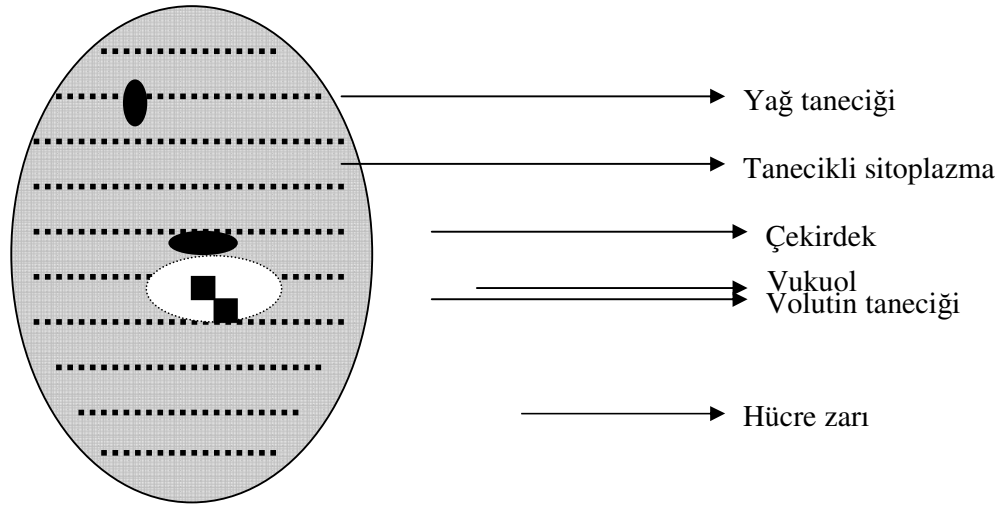
c. *Yaşlı maya*: Hücreleri ayrı ayrı yani gelişigüzel, vakuolleri çok büyümüş, sitoplazma içerisindeki tanecik sayısı çok artmış olan mayalardır.

d. *Ölü maya*: Hücreleri, büzülmuş ve küçülmüş, vakuolleri çok büyük ve gelişigüzel olan ve oval olmayan sitoplazmadaki tanecik sayısı azalmış olan mayalardır. Ölü mayalar metilen mavisi ile maviye boyandıkları için ölü maya tespiti bu boya ile yapılır.

### 2.6.2. Mayaların bileşimi ve fizyolojik yapısı

Mikroskop altında incelendiğinde bir maya hücresinin üç ana unsurdan meydana geldiği görülür (Şekil 2.6).

- a- Hücre zarı
- b- Sitoplazma
- c- Çekirdek



Şekil 2.6. Maya hücresi

Sitoplazma içinde bulunan maddeler ise;

- Vakuoller (boşluklar)
- Tanecikler
- Volutin (yağ tanecikleri içinde bulunan nüklein asidi bileşiği olan tanecikler)
- Yağ tanecikleri
- Albumin
- Enzim
- Glikojen
- Protein

- Vitaminler
- Organik ve anorganik bileşikler

Hücrenin içinde bulunan sitoplazma, açık şeffaf renkte bir mavidir. Sitoplazmanın içinde bulunan vakuoller; yaşlı ve kötü beslenen mayalarda, genç mayalarda bulunan vakuollere nazaran daha büyüktür. Vakuoller bir adet olduğu gibi 2, 3, 4, 5 adette olabilir. Sitoplazma içinde bulunan yağ tanecikleri ışığı şiddetle kırarlar.

Maya hücresi içinde bulunan “glikojen” önemli bir ihtiyaç maddesi olup, karakter bakımından hayvansal bir nişastadır. Bu madde, mayada bulunan “amilaz” enzimi vasıtasıyla glikozdan meydana getirilir ve hücre içerisinde depo edilir. Maya, istirahat devresinde bünyesinde bulunan amilaz enzimi yardımı ile glikojeni hidrolize ederek glikoza çevirir. Meydana gelen glikozu da, fermente ederek alkol haline çevirir. Mayada bulunan yağ tanecikleri, maya yaşlandıkça artar, bilhassa azotlu (N) maddelerin azlığı ve ortama fazla hava verilmesi yağ taneciklerinin sayısını artırır.

### 2.6.3. Mayaların bileşimi

Mayaların bileşimlerinin iyi bilinmesi organizmanın ihtiyaç duyduğu besin maddelerinin ve biyokütle olarak beslenmedeki yerinin tayininde önemli rol oynar. Mayalar, bileşiminde çeşitli azotlu maddeler, karbonhidratlar, yağlar, enzimler, vitaminler ve inorganik tuzlar bulunduğu için önemli besin kaynağıdır. Ayrıca pek çok enzim içerdikleri için enzim teknolojisi yönünden de önem taşırlar. Genel olarak mayaların ve ayrıca *Saccharomyces cerevisiae*'nin kompozisyonu sırasıyla Çizelge 2.2.'de verilmiştir [6]. Alkol üretiminde kullanılan mayalar tek hücreli canlılar olup klorofil ihtiva etmezler. Bu nedenle havada bulunan karbondioksitten (CO<sub>2</sub>) faydalanarak şeker ve nişasta yapacak kabiliyette değildirler. Her maya hücresi yarı geçirgen bir zarla kaplıdır. Bu zar % 70 çeşitli polisakaritlerden, geriye kalan kısmı da protein, lipotitler ve az miktarda da (% 1) chitin den teşekkül etmiştir.

Çizelge 2.2. **A**; Genel olarak tüm mayaların bileşimi, **B**; *Saccharomyces cerevisiae*'nin bileşimindeki elementler

<b>A</b>		<b>B</b>	
Rutubet, %	9,2	Toplam kül, %	6,6
Azot, %	6,5	Potasyum, %	2,2
Purine azot, %	0,3	Fosfor, %	1,1
Polisakkaritler, %	22,5	Kalsiyum, %	0,4
Lipit, %	4,2	Mağnezyum, %	0,2
Lif, elyaf, %	0,9	Kükürt, %	0,4
Kül, %	9,7	Sodyum, %	0,2
Tiamin, µg/g	28	Çinko, µg/g	42
Riboflavin, µg/g	62	Demir, µg/g	92
Niasin, µg/g	283	Bakır, µg/g	21
Pridoksin, µg/g	34	Manganez, µg/g	4

#### 2.6.4. Mayaların beslenmesi

Mikroorganizmaların gelişmesi, üremesi ve fizyolojik olarak görevlerini yapabilmeleri için gerekli gıda maddelerini içeren ortamlara ihtiyacı vardır. Bu ortamlara “besiyer ortamı” denir. Besiyer ortamı aşağıdaki maddeleri içermelidir.

1. C,H,O elementlerini içeren karbonlu gıda maddeleri
2. N (azot) elementini içeren azotlu gıda maddeleri
3. P, K, S, Mg elementlerini içeren mineral maddeleri
4. Vitaminleri

## 5. Eser elementler

Ayrıca besi ortamı belli bir sıcaklıkta ve pH da ortamın CO<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub> içeriği de belli bir oranda olmalıdır.

### Karbonlu gıda maddeleri

Karbonlu gıda maddeleri, mikroorganizmalar tarafından hem karbon hem de enerji kaynağı olarak kullanılır. Aneorobik mikroorganizmalar karbon kaynağının % 10 unu, aeorop mikroorganizmalar ise karbon kaynağının % 50–55 'ini çoğalmak için kullanırlar. Karbon kaynağı olarak; Melas, nişasta, selüloz, hidrokarbonlar kullanılır.

Ancak hidrokarbonların suda çok az çözünmeleri nedeniyle mikroorganizmaların yararlanması güç ve üreme hızları yavaş olmaktadır. Bunlar dışında çeşitli alkoller, asetatlar, yağlar ve hidrolizleri sonucu oluşan gliserin ile β-oksidasyon yolu üzerinden metabolizmaya katılan yağ asitleri, selüloz ve nişasta karbon kaynağı olarak kullanılabilir.

Kullanılan bütün besiyer maddeleri, suda çözünür ve mikroorganizmalar tarafından kolayca emilebilir özellikte olmalıdır.

### Azotlu gıda maddeleri

Azotlu besiyer maddeleri de, karbonhidratlar gibi suda çözünüp hücre duvarından geçerek kolayca hücre içerisine girebilmelidir.

Azot (N<sub>2</sub>) kaynağı olarak kullanılan maddeler:

- Üre
- NH<sub>3</sub>
- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- N<sub>2</sub>



Doğal azot kaynağı olarak;

- Soya fasülyesi
- Balık unu
- Peynir altı suyu
- Süt kullanılır.

Mayanın, bünyesinde bulunan yumurta akı maddelerini yapabilmesi için en iyi azot kaynağı olarak amonyum tuzları kullanılır. Fakat nitratlar azot kaynağı olarak genellikle kullanılmazlar. Amonyak azotunun maya hücresi tarafından kolayca hazmedilebilmesi için ortamda az miktarda azotlu organik maddelerin bulunması gerekir. Bu tuzlar anorganik azotun hazmedilmesinde katalitik etki yapmaktadırlar. K (potasyum), Mg (magnezyum), P (fosfor) azot hazmını kolaylaştırıcı olarak kullanılırlar. Gelişen maya tarafından alınan azotlu maddelerin bir kısmı maya hücresinde proteine dönüşür, diğer kısmı ise azot değişiminin bir ürünü olarak *Leuzin*, *İzoleuzin*, *Triozin* gibi maddeler halinde hücreden dışarı atılırlar. İhtiyaç duyulması halinde tekrar maya tarafından alınabilirler.

#### Mineral maddeler

Protein oluşumunda ve enzim aktivitesinin artırılmasında K, Ca, Mg, Na ve Fosfata maya şiddetle ihtiyaç duymaktadır. Özellikle fosfat önemli bir rol oynar. Bu mineral maddeleri içermeyen ortamlarda mayanın normal şekilde üremediği ve fermentasyon olayının meydana gelmediği görülmüştür.

Mayaların gelişebilmesi ve çoğalabilmesi için başta su olmak üzere karbon ve azot maddeleri, madensel maddeler ve vitaminler gereklidir. Bunlara gelişme maddeleri adı verilen ve özellikle sentetik besiyerleri ile çalışılırken önem kazanan bazı maddelerin de ilave edilmesi gerekir. Melas yukarıda sayılan gelişme maddelerini içerir. Bu nedenle melasa zorunlu olarak dışardan ilave edilmesi gereken madde yoktur. Ancak miktarı az olanların tamamlanması gerekebilir.

### Vitaminler

Biotin, tiamin ve pantoneik asit başta olmak üzere vitaminler, maya hücresi içinde gerçekleşen karboksilasyon ve dekarboksilasyon reaksiyonlarını desteklemek ve hücre zarını korumak gibi özelliklerinden dolayı gerekli maddelerdir.

### Eser elementler

Besi ortamına ilave edilen eser elementler, mikroorganizmaların gereksinmelerine göre üç gruba ayrılırlar.

- ✓ Gelişme için mutlak olarak gerekli elementler: Bunlar; Ca, Mn, Fe, Co, Cu, ve Zn'dur.
- ✓ Gelişme için daha az gerekli elementler: Bunlar; B, Na, Al, Si, Cl, V, Cr, Ni, As, Se, Ma, Sn ve I'dur. Mikroorganizmalara göre ise gereksinim oranları değişir.

Gelişme için çok ender gerekli elementler de Be, F, Sc, Ti, Ga, Ge, Br, Zr ve W'dur. Fermentasyon işleminde kullanılan su içinde bu elementlerin birçoğu bulunabildiği için genellikle ayrıca ortama ilave edilmelerine gerek yoktur [7].

### **2.6.5. Mayaların gelişmesini ve fermentasyon performanslarını etkileyen etmenler**

#### Sterilizasyon

Mikrobiyolojik çalışmaların her safhasında kullanılan aletlerin, katı ve sıvı gıda ortamlarının, her çeşit zararlı mikroorganizmalardan temiz hale getirilme işlemidir. Sterilizasyon, yakma, buharlama, etüvde ısıtma veya ışınlama suretiyle gerçekleştirilir.

#### Sıcaklık

Alkol mayalarının en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık 30 °C'dir. Reaksiyon ortamının sıcaklığının artması ile reaksiyon hızı da artar, bu artış en yüksek bir noktaya kadar devam eder sonra yavaş yavaş azalarak neticede enzim tahrip olur. Genellikle her 10°C lik sıcaklık artışına karşılık reaksiyon hızı iki kat artar. Reaksiyon hızının En yüksek olduğu sıcaklık *optimum sıcaklıktır*. Özellikle enzimler 45°C nin altında faaliyet gösterirler, 70°C nin üzerindeki sıcaklıklarda ise tahrip olurlar.

Fevala ve arkadaşları, çalışmalarında *Zymomonas mobilis* mayasıyla yüksek verim için sürekli sistemde etanol fermentasyonuna pH, sıcaklık ve sakkaroz derişiminin etkisini incelemişlerdir. Çalışmada *Zymomonas mobilis*'in bir çöktürücü türü kullanılmıştır. Bir fermentör kullanarak hücre geri dönüşümüyle yüksek şeker dönüşümü ve etanol verimi elde edilmiştir. 100 gL<sup>-1</sup> derişimi sakkaroz içeren bir ortamda 0,5 h<sup>-1</sup> seyreltme hızında etanol oluşumu, verimi ve derişimi sırasıyla 20 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, 0,45 gg<sup>-1</sup> ve 40 gL<sup>-1</sup> dir. Şeker dönüşümü %96 olarak bulunmuştur. Sakkaroz derişimi 150 gL<sup>-1</sup> olduğunda etanol derişimi 60 gL<sup>-1</sup>'ye ulaşmıştır. Levan ve frukto-oligomer oluşumu nedeniyle teorik verim %80 olmuştur. Sorbitol belirlenmemiştir. Bu fermentasyon 30-36 °C sıcaklığında ve pH 4,0-5,5 aralığında yapılmıştır [8].

### pH

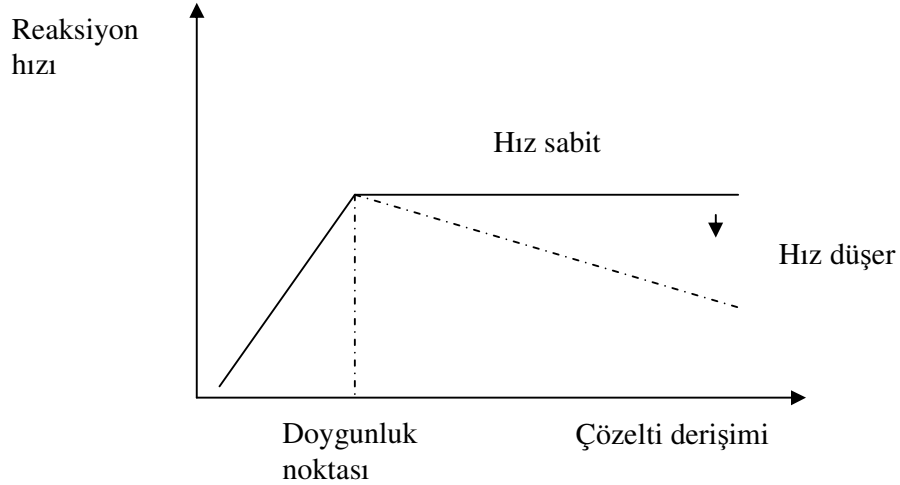
Hidrojen iyonu derişimi enzimler üzerine etki yapmaktadır. Bazı enzimler asidik ortamda, bazıları nötr ortamda, bazıları ise bazik ortamda faaliyet gösterirler.

Mayalar için genelde pH 3 ila 6 arasındadır. *Saccharomyces cerevisiae* mayasıyla etanol üretiminde optimum pH değeri 4,25 olduğu belirlenmiştir [9].

### Çözelti (ortamdaki substratın) derişiminin etkisi

Mayalar içinde buldukları ortamda çözülmüş bulunan gıdalarla beslenirler. Bu gıdaların hücre duvarlarından içeriye osmoz yolu ile geçebilmeleri için belirli bir derişimde olmaları gerekir. Belli bir madde derişimine kadar aktivite hızı artar,

sonra sabit kalır bazen de düşer. Hızın sabit kaldığı noktadaki derişime maddenin “doyunluk derişimi” denir ( Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Çözelti derişiminin maya aktivite hızına etkisi

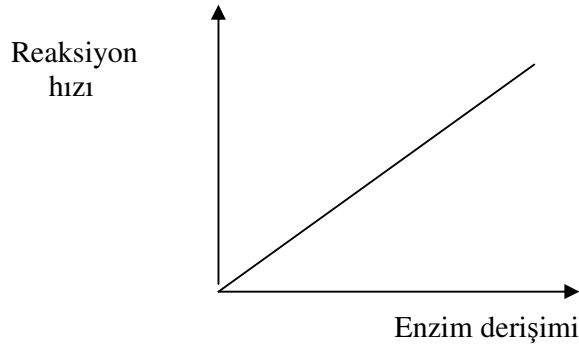
Burada iki olay gerçekleşir.

- 1- Substratın inhibisyonu ( substratın enzime zehir etkisi)
- 2- Ürün inhibisyonu ( ürünün enzime zehir etkisi)

Substratın (mayaların içinde buldukları besiyer ortamı) derişimi enzim derişiminden düşük ise substrat derişimi belli bir noktaya kadar arttırıldıkça reaksiyon hızı artmakta, substrat derişimi enzim derişimine eşit olunca reaksiyon hızı sabit kalmakta, substrat derişimi enzim derişimini geçince reaksiyon hızı düşmektedir.

### Enzim (maya) derişimi

Maya derişimi arttıkça mayanın çoğalma hızı artar. Dolayısıyla enzim aktivitesi de artar (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Enzim derişimi- reaksiyon hızı

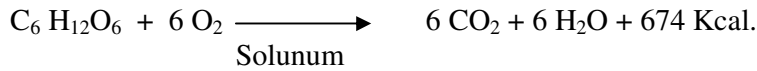
Burada ortamdaki besiyer madde derişimi sabittir.

Substratın derişimi sabit olmak koşuluyla enzim derişimi artırıldığı zaman reaksiyon hızı artmaktadır. Reaksiyon hızı enzim derişiminin kare kökü ile doğru orantılıdır.

### Oksijen

Maya üretiminde verilen havanın (oksijen) iki önemli fonksiyonu vardır.

- a- Çözelti içerisindeki maya hareketini sağlamak,
- b- Karbonhidratları parçalayarak gerekli olan enerjiyi sağlamak



Havalandırılan ortamdaki şekerin fermentasyonu, hava verilmeyen ortama nazaran daha hızlı olmaktadır. Fakat havalandırılan ortamın alkol verimi daha düşük olmaktadır. Fazla miktarda hava fermentasyonu hızlandırmaktadır. Bunun nedeni ise fazla hava ile meydana gelen ve fermentasyon olayına katılan maya miktarının artmasıdır. Maya miktarının artması, şekerin alkol üretimi yerine maya üretimine harcanmış olmasından kaynaklanmaktadır. Sonuç olarak daha çok havalandırılan ortamlardaki alkol verimi daha düşük olmaktadır.

### Maya hareketi

Maya hareketi sisteme verilen hava ile sağlanmaktadır. Böylece maya dağıtılmış ve mayanın daha rahat beslenmesi sağlanmış olur. Gerek maya çoğalması gerekse fermantasyon esnasında mayanın meydana getirdiği çeşitli maddeler mayanın etrafından ne kadar çabuk uzaklaştırılır ise mayanın beslenme şartları o nisbette iyileşir. Böylece mayaların ortamda bulunan kullanılmamış gıda maddeleri ile teması hem kolaylaşmış olur hem de hızlı olur. Bu şekilde iyi beslenen mayanın çoğalma hızı ve fermantasyon kabiliyeti artar.

Maya hareketi iki şekilde olur. Birincisinde, mayalar fermentasyon ortamı ile birlikte hareket ederler, ikincisinde ise mayalar bir yerde sabit tutulup ortam hareket eder. Alkol fabrikalarında fermantasyon ünitesinde sisteme hava verilmeyip fermantasyon sırasında oluşan karbondioksit gazı nispeten karıştırma görevi yapmaktadır. Fakat bu yeterli değildir. Maya üretim ünitesinde ise bu hareket hava ile sağlanmaktadır. Sisteme verilen hava hem sirkülasyonu sağlarken hem de maya verimini artırmaktadır. Mayanın sabit, fermentasyon ortamının ise hareketli olmasına örnek “Süratli sirke üretimi” usulüdür. Bu usulde sirke bakterileri odun talaşları üzerinde durduğu halde sirke mayşesi (sulu alkol) talaşlar üzerinden aşağı doğru sızar. Böylece alkol kısa sürede sirkeye dönüşür.

### Basınc

Birkaç atmosferlik hidrostatik basıncın maya üremesi ve enzim aktivitesi üzerine fazla bir etkisi yoktur. Bunun yanında osmatik basıncın maya üremesi üzerine çok büyük bir etkisi vardır. Ortamdaki aşırı tuz derişimi, osmatik basıncı artırarak hücrenin su kaybetmesine yol açar. Bunun sonucu olarak mayanın üremesi yavaşlar veya durur.

### İyon şiddeti

İyon şiddeti arttıkça enzim aktivitesi de artar.

### Radyoaktif ışınlar

Mayalar canlı organizmalar olduklarından, radyoaktif ışınlardan (ultraviyole) etkilenirler. Bunun sonucu olarak enzimatik reaksiyonları yavaşlar ve aktivitelerini kaybederler.

### Zaman

Zaman arttıkça enzim aktivitesi düşer. Enzim aktivitesinin düşmesi ile reaksiyon hızı düşer. Bunun için uzun süre çalışılan enzimlerin yenilenmesi gerekmektedir.

### Kimyasal etkiler

Maya üretimi veya fermantasyon esnasında ortama verilen bazı maddeler enzim aktivitesini artırır bazıları ise enzim aktivitesini düşürür.

- a. Aktivatörler: Enzim aktivitesini artıran maddelerdir.
- b. İnhibitörler: Enzim aktivitesini düşüren maddelerdir (maya zehirleri gibi).

Aktivatörler; temas yüzey alanını artırarak substratı enzime karşı daha aktif yaparlar. Ayrıca enzim zehirlerinin hareketine mani olarak enzimi zehirlerden korurlar. Metal iyonları;  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$  vs. iyonları birer aktivatördür. Melastan etanol üretiminde bu metal iyonlarının çoğunun olmasına karşılık enzim aktivitesini artırmak için  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$  (amonyum) azotu ve fosfor tuzları da ilave edilir.

Canlı varlıkların hayati faaliyetlerini azaltan veya tamamen önleyen ve nihayet onların ölümlerine sebep olan maddelere genellikle zehir adı verilir. Zehirler her maya için aynı derecede etki etmezler. Hatta zehirler mayşe(sulu alkol) sıcaklığı ve mayşede bulunan besleyici maddelere göre de çok değişik tarzlarda etki ederler.

Zehir etkisi yapan inhibitörler enzime bağlandığı zaman enzimin aktif merkezini konformasyon değişikliğine uğratarak substratın enzime bağlanmasını engellerler. Bazen de oluşan ürün enzime inhibitör etkisi yapmaktadır. Civanın çözünmüş tuzları, bazı proteinler, alkol, eter, formaldehit gibi maddeler mayalara inhibitör etkisi gösterirler.

Zehir tesiri yapan maddeler mayalar üzerinde etkisini iki şekilde gösterirler.

1. Üremeye engel olurlar
2. Fermantasyon kabiliyetini azaltırlar.

Genellikle mayalarda her iki etki birden görülür. Onun için maya çoğaltma ve fermantasyon istasyonlarına bu gibi maddelerin girmesine kesinlikle engel olmak gerekir. Zehirler genellikle protoplazmaya etki edip hayat fonksiyonunu yok ederler. Fakat daha önce protoplazmadan ayrılmış bulunan enzimlere tesir etmezler. Fakat enzimlere de etki eden zehirler vardır.

### Su

Bütün organizmalar gibi mayanın da hücre gelişmesi ve gerekli hidrostatik ve osmotik basınçların düzenlenmesi açısından suya ihtiyacı vardır. Ayrıca suyun metabolizmada hidroliz ve kondensasyon gibi kimyasal tepkimelere katılmak gibi görevi de vardır. Hücrede suyun bulunmasına kesin ihtiyaç olduğu gibi besin maddelerinin çözünmesi için de yeterli miktarda suyun bulunması gerekir. Çünkü besin maddeleri ancak suda çözülmüş bir halde hücre içine geçebilirler.



### Metabolizma ürünleri

Fermentasyon boyunca çeşitli metabolizma ürünleri oluşur (organik asitler, etanol gibi). Oluşan laktik, asetik, propiyonik, valerik ve bütirik asitler ortamın pH değerini düşürürler ve önceki bölümde anlatıldığı şekilde maya gelişimi üzerinde zararlı etkilere neden olurlar. Oluşan ürünlerden biri olan etanolün osmotik basıncı da maya üzerinde etkilidir. Eğer fermente olmuş sıvıdaki etanol derişimu, tüm şeker tüketilmeden önce maya üzerinde olumsuz etki gösterecek seviyeye ulaşırsa kalan şeker tüketilemez ve atık olarak kalır.

Ngang ve arkadaşları, çalışmalarında maya fermentasyonu parametrelerine laktik asidin etkisini incelemişlerdir. Endüstriyel pancar melası bazı bakteriler için, özellikle laktik asit bakterileri için çok iyi bir substrattır. Bu inhibitör mayanın spesifik büyüme hızını ve alkol üretim hızını osmotik basınca bağlı olarak farklı yollarla etkiler. Etkilenen en önemli parametre mayanın büyümesidir. Çok miktarda mayanın aşılmasıyla inhibisyon olayı azaltılabilir [10].

Brown, S. ve arkadaşları çalışmalarında iki mayanın gelişimi ve fermentasyonu üzerine etanolün etkilerini incelemişlerdir. Etanolün büyümeye etkisi iki maya içinde benzerlik göstermiştir. Etanol, büyüme hızının ve hücre yaşayabilirliğinin inhibisyonuyla sonuçlanan karmaşık bir kinetik göstermiştir. Etanolün fermentasyona olan inhibisyon etkisinin büyümeye olan inhibisyon etkisinden az olduğu belirlenmiştir [11].

### **2.7. Kesikli Reaktör Fermentasyon Kinetiği**

Bir miktar maya uygun şekilde tasarımı yapılan bir besi ortamına eklenince ürer. Üreme, biyokütlenin ağırlığı, hacmi, sayısı ve azot içeriği vb. gibi ölçülebilen bir özelliği ile izlenir. Besi ortamında bulunan ve üremeyi sınırlayan besinlere “substrat” denir.

Fermentasyonda üreme, substrat tüketimi ve ürün oluşum kinetiklerinin matematiksel modellenmesi veri analizlerini kolaylaştırır ve endüstriyel fermentasyon proseslerinde karşılaşılabilecek problemlerin çözümüne temel teşkil eder. Kinetik modellemeyle sağlanacak değişken ve parametreler reaktör tasarımında kullanılır. Besi ortamında gelişmenin ve üremenin gerçekleştiği tepkime kaplarına genel olarak “biyolojik reaktörler” veya “biyoreaktörler”; biyokütle ve ürün üretiminde kullanılanlara da “fermentör” denir.

Günümüzde gelişmiş ülkelerde bilgisayar aracılığı ile kontrol edilen çok iyi geliştirilmiş fermentörlerden yararlanılarak fermentasyon araştırmaları yürütülmekte ve bu çalışmalar teknolojiye aktarılmaktadır. Fermentörler;

- ✓ Kesikli
- ✓ Sürekli-beslemeli
- ✓ Sürekli karıştırılmalı
- ✓ Borusal akım reaktörleri, tipinde olabilir.

Bu çalışmada fermentasyon kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir.

### **2.7.1. Mikroorganizmaların üreme kinetiği**

Mikroorganizmaların gerekli besin ve uygun koşulları içeren besi ortamında gelişme ve üremelerine kültürleme denir. Kesikli kültür sistemlerinde üreme kapalı bir sistem veya kapalı bir çevrede gerçekleşir. Kesikli kültür sistemleri uygun üreme ortamı içeren bir kap veya fermentör olup optimum pH ve sıcaklık koşullarında çalıştırılırlar. Üreme, ortamdaki gerekli bileşenlerin tükenmesi veya zehirleyici ürünlerin birikimi, pH değişimi gibi değişiklikler gözlenene kadar devam eder.

### **2.7.2. Mikroorganizmaların yaşam evreleri**

Kültür ortamına aktarılan mikroorganizmaların sabit pH, sıcaklık, iyon kuvveti ve basınç gibi çevre koşulları altında, belirli substrat derişiminde gelişme ve üremeleri

çeşitli evrelerden geçmektedir. Mikroorganizmaların üreme hızı genel olarak aşağıdaki eşitlikle ifade edilir:

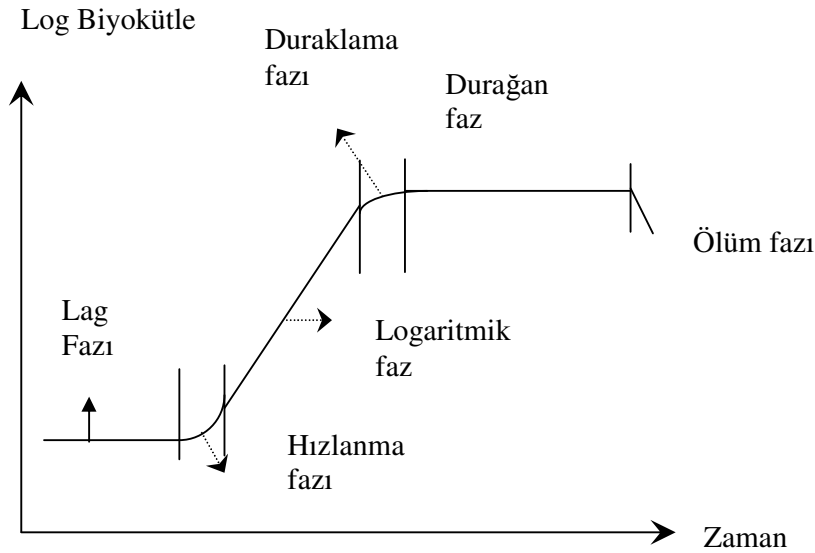
$$dx / dt = \mu x \quad (2.1)$$

$\mu$  = Spesifik üreme hızı

$x$  = Mikroorganizma derişimi

$dx / dt$  = Üreme hızı

Mikroorganizmaların yaşam evreleri Şekil 2.9'de gösterildiği gibi altı evreden oluşmuştur. Bunlar; gecikme (Lag) fazı, hızlanma veya geçiş fazı, logaritmik faz, duraklama fazı, durağan faz ve ölüm ya da gerileme fazı olarak adlandırılırlar.



Şekil 2.9. Mikroorganizmaların yaşam evreleri

### Gecikme (Lag) fazı

Mikroorganizmaların kültür ortamına uyum gösterip çoğalmaya başlamasına kadar belirli bir süre geçmesi gerekir. Bu esnada mikroorganizma sayısında hemen hemen hiçbir artış görülmez. İşte bu süre mikroorganizma için “gelişme” ya da “gecikme” evresi (lag faz) olarak adlandırılır. Bu evre yeni ortama uyum, onarım, besinlerin hidrolizi, transfer ve özütlenmesi, enzim sentezi için gerekli faz olup biyoteknolojik

tasarımlarda kısa olması istenir. Mikrobiyal teknolojide bu sürenin kısaltılması ekonomik açıdan büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla aşı mikroorganizmalar, biyolojik reaktörlerin koşullarına uygun bir biçimde hazırlanmalı ve ayrıca mikroorganizmaların bu evrenin büyük bir kısmını laboratuvar kültürlerinde geçirmeleri ve kültür genişletme işlemleri ile de mikroorganizmaların reaktör koşullarına uyumu sağlanmalıdır. Gecikme evresinin reaktör dışında geçirilmesinin diğer bir önemi ise de; fermentasyon sırasında en önemli sorunlardan biri olan sterilizasyondur. Sterilizasyon oldukça güç ve pahalı bir işlemdir. Bu nedenle fermentasyon süresi ne kadar kısa olursa, kirlenme o denli az olacak ve sterilizasyon işlemi için fazla enerji ve emek harcanmayacaktır. Fermentörde bu evrenin kısaltılabilmesi için ayrıca, aşı kültüründen daha fazla mikroorganizma alınmalıdır. Örneğin; mayalarda bu oran yaklaşık %5'dir. Lag fazında üreme olmadığı için;

$$\mu = 0 ; dx / dt = 0 \quad (2.2)$$

### Hızlanma fazı

Gelişme evresinden sonra mikroorganizma sayısında yavaş yavaş artış başlar ki bu safhaya “hızlandırılmış” ya da “hızlandırılma evresi” denilmektedir.

### Logaritmik faz

Hızlanma safhasında artmaya başlayan mikroorganizma sayısı belirli bir düzeye ulaşıncaya “logaritmik evreye” ulaşılır. Logaritmik evrede, mikroorganizmalar eksponansiyel olarak arttığı için kesikli kültürleme yönteminde ortamdaki besinler giderek azalır. Ayrıca ortamda inhibisyon etkisi yaratabilecek ürünler oluşabileceği için mikroorganizmaların ideal ve en yüksek derişimine erişilemez. Sürekli kültürlemede, ortama sürekli olarak taze besin eklendiği ve oluşan ürünler de ortamdan uzaklaştırıldığı için ideal logaritmik evreye ulaşılabilir. Logaritmik evrede biokütle artış hızı  $dx/dt$ , mikroorganizma derişimu  $x$  ile orantılıdır.

Buna göre logaritmik üreme hızı:

$$dx / dt = \mu x \quad (2.3)$$

bağıntısı ile gösterilmekte olup, birinci dereceden bir reaksiyon eşitliği oluşturur.  $\mu$  ; spesifik üreme hızı olup Eş.2.3'den çözülürse,

$$\mu = 1/x (dx / dt) \quad (2.4)$$

Eş.2.4 de görüldüğü gibi, birim derişimdeki biyokütle fraksiyonel artış hızını verir. Birimi zaman<sup>-1</sup> dir. Eş. 2.3'ün

$$t = 0 \text{ için } x = x_0 \text{ ve } t = t \text{ için } x = x$$

sınır şartları kullanılarak integrali alınır ;

$$\int_{x_0}^x \frac{dx}{x} = \mu \int_0^t dt \quad (2.5)$$

$$\text{Ln}x = \text{Ln}x_0 + \mu t \quad (2.6)$$

$$x = x_0 e^{\mu t} \quad (2.7)$$

Eş.2.6 elde edilir. Burada  $x_0$ , başlangıçta ( $t=0$  anında) kültür ortamına aşılana mikroorganizma derişimi,  $x$  ise herhangi bir  $t$  ( $t=t$ ) anındaki mikroorganizma derişimidir. Eş.2.6 bir doğru denklemini olup ordinatı kesme noktası  $x_0$ , eğim ise  $\mu$ 'yü verir. Logaritmik fazda besin maddeleri azalırken biyokütlede artış görülür, dolayısıyla ürün miktarında da artış olur.

### Duraklama fazı

Logaritmik fazda hızlı bir artış gösteren mikroorganizmalarda yavaş yavaş yaşlanma ve ölüm olaylarının belirginleşmeye başlaması nedeniyle, çoğalma yavaşlar ve üreme hızında azalma gözlenir. Bu nedenle bu evre “duraklama fazı” olarak adlandırılır.

### Durağan faz

Duraklama fazını takiben, kesikli kültürleme işleminde “sabit faz” gözlenir. Kesikli kültürde besin maddelerindeki azalma, inhibisyon etkisi olan ürünlerin artışı gibi nedenlerle, mikroorganizmaların bazıları üremeye devam ederken, bazıları ölür bazıları da üremeden ancak yaşamlarını sürdürür. Bu üç faktör birbirini öylesine dengelemektedir ki, mikroorganizma miktarında zamana göre net artış ya da azalış görülmez. Bu evrede mikroorganizmalar, depo maddelerinden ve proteinlerinden yararlanabildiği sürece yaşamaya devam eder. Substrat azalması ve ürün inhibisyonu sınırlayıcı etkindir.

$$dx / dt = 0$$

$$\ln (x / x_0) = \text{Sabit}$$

Durağan fazda çoğu zaman  $x = x_{\max}$  olur.

### Ölüm fazı

Şekil 2.9'daki grafikte görüldüğü gibi mikroorganizma yaşam kinetiğinin son aşamasında, mikroorganizmaların ölüm hızları arttığı için zamanla derişimlerinde azalma gözlenir. Bu fazda mikroorganizmaların, ortama salgıladıkları enzimlerden dolayı hücre zarlarında hidroliz ve parçalanma olayları belirginleşir. Mikroorganizmaların yaşam kinetiğinin bağıntıları genellikle bakteriler üzerindeki

incelemelere dayanarak türetilmiştir. Ancak bu bağıntılar genellikle tüm mikroorganizmalar için geçerli sayılmaktadır. Ölüm hızı;

$$-dx/dt = \mu_d x_{max} \quad (2.8)$$

$\mu_d$  = Spesifik ölüm hızı sabiti

$X_{max}$  = Durağan faz biyokütle derişimi [6]

## 2.8. Metal İyonlarının Maya ve Etanol Fermentasyonu Üzerindeki Rolü

Bu bölümde potasyum, sodyum, çinko, magnezyum, mangan ve kalsiyumun maya ve etanol fermentasyonu üzerindeki rolü üzerinde durulmuştur.

Fermentasyon ortamında bulunan metal iyonlarının derişimi mikroorganizmalar için oldukça önemlidir. Bu değerler belli bir değer üzerinde olduğunda veya gerektiğinden az olduğunda mikroorganizmanın gelişimi ve fermentasyon aktivitesi olumsuz yönde etkilenir.

*Potasyum:* hücre içi ve dışı osmotik basıncı kontrol altında tutması ve glikoliz evresinde fosfatın hücre içine alınmasında önemli rol oynar.

Ryan ve Johnson çalışmalarında, 100 gL<sup>-1</sup> sakkaroz ve derişimi 0,4 ve 13,5 gL<sup>-1</sup> arasında değişen potasyum içeren yapay melasta, potasyumun etanol üretimine etkisini araştırmışlardır. Çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* ml'de 10<sup>5</sup> tane olacak şekilde kullanılmış, üretilen etanol gaz kromatografisinde, şeker derişimi de sıvı kromatografisinde ölçülmüştür. Etanol üretim hızı, 0,4 gL<sup>-1</sup> potasyum miktarı ile 0,4 gL<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> iken, 10,5 gL<sup>-1</sup> potasyumun fermentasyon ortamında bulunmasıyla, 1,2 gL<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> değerine ulaşmıştır. Ancak potasyumun 10,5 gL<sup>-1</sup>'den daha yüksek derişimlerinde etanol üretiminde azalma görülmüştür ( 13,5 gL<sup>-1</sup> potasyum derişimiyle 0,2 gL<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> etanol üretim hızı belirlenmiştir) [21].

Kirk ve arkadaşları, çalışmalarında *Zymomonas mobilis* ile sakkarozun etanolik fermentasyonuna potasyum ve klorür iyonlarının etkisini araştırmışlardır. *Zymomonas mobilis*'in kesikli sakkaroz fermentasyonuna belirli tuzların ilavesi ürün oluşumuyla sınırlanabilir. Sorbitol ve frukto-oligosakkarit oluşumu sınırlanabilir ve etanol üretimi mineral tuz derişimleri ayarlanarak arttırılabilir. Çalışmada  $10 \text{ gL}^{-1}$  NaCl veya  $\text{MgCl}_2$  den daha düşük derişimlerde klorür tuzları biyokütle ve sorbitol oluşumunu frukto-oligosakkarit oluşumu yönünde azaltmıştır.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $< 20 \text{ gL}^{-1}$ )'un düşük derişimleri biyokütle oluşumunu arttırmış ve beraberinde frukto-oligosakkarit oluşumunu azaltmış ve etanol oluşumunu olumlu yönde arttırmıştır.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 'ün  $20 \text{ gL}^{-1}$ 'nin üzerindeki derişimlerinde etkisi klorür tuzlarınkine benzemiştir. Fermentasyonun başında ortama invertaz ilavesi sorbitol oluşumunu arttırmış fakat sakkaroz hidrolizinin tamamlanmasından sonra ilavesi frukto-oligosakkaritlerin fruktoz veya etanole dönüşmesiyle sonuçlanmıştır [13].

Chandranasena ve arkadaşları çalışmalarında, hazırladıkları sentetik melas ortamında, kesikli sistemde,  $5 \times 10^6$  hücre/ml *Saccharomyces cerevisiae* kullanarak ve 75 rpm çalkalama hızında,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ve  $\text{Ca}^{2+}$  metal iyonlarının değışen derişimlerinde deneyler yaparak elde ettikleri etanol verimini ölçmüşlerdir. Çalışmada amaçlanan, bu üç metal iyonunun, etanol fermentasyonunda, kendi arasındaki etkileşimin araştırılmasıdır. Yapay melas,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ve  $\text{Ca}^{2+}$  katyon derişimleri düşük, orta ve yüksek değerleri sırasıyla, 2159-5102-7251, 16-70-270 ve 71-509-1027  $\text{mgL}^{-1}$  olacak şekilde hazırlanmıştır. İstatiksel analizler sonunda, magnezyumun artan derişimlerinde etanol veriminin arttığı ve p değerleri dikkate alındığında ( $p < 0,01$ ) her üç metal iyonunun da etanol üretiminde etkili değışkenler olduğu ortaya çıkmıştır. ANOVA testi ile magnezyumun sabit derişimlerinde, potasyum ve kalsiyumun etanol üretimi üzerine etkileri belirlenmiştir. Magnezyumun  $16 \text{ mgL}^{-1}$  derişiminde, potasyum ve kalsiyumun verimde önemli ölçüde etkili olduğu ( $p < 0,01$ ) ve kalsiyumun düşük magnezyum verimi azaltıcı yönde etkisinin olduğu,  $70 \text{ mgL}^{-1}$  magnezyum derişiminde, magnezyum ve kalsiyum oranının artmasının verimi önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir, magnezyumun  $270 \text{ mgL}^{-1}$  derişiminde, artık kalsiyumun verim üzerinde etkisinin kalmadığı buna karşın potasyum



derişiminin etkisinin devam ettiği ( $p < 0,01$ ) belirlenmiştir. Çalışmada, potasyum ve kalsiyumun etanol verimini en yüksek yapan miktarlarına magnezyumun ortamda yüksek ve orta seviyedeki derişimlerinde ulaşılmış olması bu iki iyonun etkisinin magnezyumun derişimine bağlı olduğuna dikkat çekilmiş ve bu üç iyonun ( $K^+ : Mg^{2+} : Ca^{2+}$ ) etanol verimini en yüksek yapan birleşimleri, 2,154:270:1,118-5,102:70:509- 7,231:16:1,006 ( $mgL^{-1}$ ) ve etanol verimleri sırasıyla 7,88-7,08 ve 5,63 % ( $vv^{-1}$ ) olarak belirlenmiştir [14].

*Sodyum*: mayanın sodyuma ihtiyaçı vardır ancak ortamda yüksek derişimde bulunduğunda, hücre yapısı, enzim aktivitesi dolayısıyla glikoliz evresi zarar görür. Sodyum, potasyumla hücre içine alınması konusunda yarışır ve potasyumun hücre tarafından alınmasını engeller ve yararlı etkilerini inhibe eder.

Vriesekop ve arkadaşları çalışmalarında, *Zymomonas mobilis* mayasının kullanıldığı fermentasyon ortamındaki sodyumun etanol üretimine etkisi üzerinde durmuşlar ve ortamda sodyum iyonu olduğunda hücre gelişimi ve etanol üretiminin olumsuz yönde etkilendiği belirlenmiştir [15].

Garcia ve arkadaşları yaptıkları çalışmanın bir bölümünde, *S. cerevisiae* ve *C. tropicalis* mikroorganizmalarının, ortamdaki  $Na^+$  ve  $K^+$  iyonlarını bünyelerine almaları ve bu iyonların mikroorganizma gelişimi üzerindeki etkileri üzerinde durmuşlardır. Mikroorganizmanın gelişiminin, adsorplanan Na:K oranının artmasıyla zarar gördüğü belirlenmiştir [16].

Prista ve arkadaşları, sodyum, potasyum ve lityumun, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Debaryomces hansenii* mayalarının gelişimi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Çalışma, potasyum 0 ile 36,7 mM, sodyum derişimi ise 0 ile 2 M değerleri arasında değişen miktarlarındaki ortam şartlarında gerçekleştirilmiştir. *Debaryomces hansenii*'nin gelişim hızı, düşük potasyum (0,05 mM) ve yüksek sodyum derişimlerinde (1M)  $0,20 s^{-1}$  iken, *Saccharomyces cerevisiae* ise bu şartlarda çoğalma gösterememiş ancak yüksek potasyum (36,7 mM) ve düşük sodyum (0,6 M)

şartlarında  $0,13 \text{ s}^{-1}$  gelişim hızına ulaşmıştır. Sodyumun *Saccharomyces cerevisiae* üzerindeki zehirleyici etkisi, hücrenin potasyum alımını sodyumun engellemesi ve hücre içinde potasyumun azalarak sodyumun birikmesi şeklinde açıklanmıştır. Ortamdaki Na:K oranı 0,7'nin üzerinde olduğunda *Saccharomyces cerevisiae*'nin gelişimi olumsuz yönde etkilenmiş ve iki mikroorganizmadan *Debaryomces hansenii*'nin sodyuma karşı daha dirençli olduğu belirlenmiştir [17].

**Çinko:** mayanın fermentasyon performansı için gerekli metal iyonlarından biridir . Hücre metabolizmasında, ribofilin ve protein sentezinde katalitik kofaktör olarak çalışır. Ayrıca çinko, hücre zarı dışında serbest halde bulunan şeker moleküllerinin, zar içinde kimyasal reaksiyonla fosfatlanarak içeri alınmasını kolaylaştırır. Çinkonun besi ortamında yüksek derişimlerde bulunması, potasyumun hücre zarından geçişini olumsuz yönde etkileyeceğinden hücre gelişimi ve fermentasyon üzerinde zehirleyici etki gösterir [18]. Çinkonun olmadığı ortamda veya yüksek derişimlerinde hücre ve fermentasyon performansı zarar görür.

**Magnezyum:** hücre metabolizması ve gelişimi için gerekli metal iyonlarından biridir. Hücreyi, ısıl şok, osmotik basınç ve etanol toksitesine karşı korur. Glikoliz aşamasında 300'den fazla enzimin (heksokinas, purivat kinas, fosfofrukto kinas, fosfogliserat kinas, enolas gibi) sentezinde rol oynar. Ayrıca magnezyum, hücre zarındaki  $\text{H}^+$ - ATP aktivitesini hızlandırır [19]. Sadece magnezyumun tek başına etkisinin yanında magnezyum kalsiyum oranı da önemlidir. Eğer gelişme ortamında magnezyuma göre aşırı miktarda kalsiyum olursa, magnezyumun hücre plazmasına transferi yavaşlar. Dolayısıyla hücre gelişimi ve iyi bir fermentasyon için magnezyum kalsiyum oranının yüksek olması gereklidir. Magnezyumun da yüksek derişimlerinde hücre solunumu olumsuz yönde etkilenmektedir.

Mahler ve arkadaşları, Mg iyonlarının oksijen sınırlı ortamda *Pichia stipitis*' in mayalanma ve solunum fonksiyonlarına etkisini araştırmışlardır. Mikroaerofilik şartlar altında yapılan çalışmada  $\text{Mg}^{2+}$  iyonlarının miktarı büyümeyi, xylitol ve etanol

üretimini etkilemiştir. Düşük miktarlardaki  $Mg^{2+}$  iyonları karbon akışını etanolden xylitole yönlendirmiştir [20].

Pironcheva, çalışmasında bira fermentasyonunda magnezyum iyonlarının etkisini incelemiştir. C1028 kodlu bira mayası *Saccharomyces cerevisiae* aerobik koşullarda yetiştirildiğinde etanol üretimi  $Mg^{2+}$  derişiminin 0,7 mM seviyesine kadar hiperbolik bir artış göstermiştir. Çalışmada, hücrelerin sabit büyüme fazına girişi ile En yüksek etanol ve minimum şeker derişimlerinin zamanı ile büyüme ortamındaki En yüksek  $Mg^{2+}$  derişimi ilişkilendirilmiştir. Maya hücreleriyle magnezyum birikiminin bira üreten biyoteknoloji dallarında yararlı olabileceği önerilmiştir [21].

*Mangan:* hücrede protein ve tiamin sentezi için gereklidir.

*Kalsiyum:* hücre gelişimi için gerekliliği tartışmalıdır. Çünkü ortamda fazla miktarlarda bulunmasıyla, magnezyumun yararlı etkisini engellemektedir [14].

Göksungur ve arkadaşları, çalışmalarında dolgulu yatak biyoreaktörde Ca- Aljinatta tutuklanmış *Saccharomyces cerevisiae* ile pancar melasından sürekli yöntemde etil alkol üretimini araştırmışlardır. Çalışma sıcaklığının 30 °C, kullanılan seyreltme hızının 0,22 s<sup>-1</sup> olduğu çalışmada en yüksek etil alkol (4,62 %), teorik verim (82,9 %) ve hacimsel verimlilik (10,16 gL<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>) değerleri % 10,90 başlangıç şeker derişimi içeren ortamda, %2 Na-aljinattan üretilen, 2,0-2,4 mm çapındaki boncuklarla elde edilmiştir. Daha yüksek substrat derişimlerinde verim değerlerini artırmak ve ortamda kullanılmadan kalan şeker miktarını azaltmak için substrat biyoreaktörden tekrar sirküle edilmiştir. Biyoreaktör 0,22 s<sup>-1</sup> seyreltme hızında fermentasyon kapasitesinde önemli değişiklik olmadan sürekli sistemde 25 gün boyunca çalıştırılmıştır. Sürekli karıştırmalı tank tipi biyoreaktörde yapılan denemede ise dolgulu yatak biyoreaktöre göre daha düşük etil alkol derişimi (3,94 %), teorik verim (70,7 %) ve verimlilik (8.67 gL<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>) değerleri elde edilmiştir [22].

Sreekumar ve arkadaşları, çalışmalarında *Zymomonas mobilis* ZM4 ve bir mutant ZMI<sub>2</sub> ile yapılan yüksek şekerli fermentasyon ortamında kalsiyum ve sodyum

tuzlarının etanol üretimine etkisini incelemişlerdir. Özellikle glikoz ve sakkarozun yüksek derişimlerinde (200-400 gL<sup>-1</sup>) ve olabildiğince yüksek sıcaklıkta (42 °C) CaCO<sub>3</sub> ilavesinin etanol üretimini arttırdığını belirlemişlerdir. Kalsiyum ve sodyum karbonat ortamda üretilen asidi nötralize etmiş ve etanol üretimini arttırmıştır. Sodyum tuzlarının maya üzerinde daha az etkili olduğu ve mutant için tercih edilmediği görülmüştür. Kontrollü pH ortamında kalsiyum klorürün etkisiyle Ca<sup>2+</sup> iyonlarının etanol üretimini arttırmada doğrudan rol oynadığı belirlenmiştir [23].

## **2.9. Fermentasyon Ortamına Eklenen Maddelerin Etanol Üretimi Üzerine Etkileri**

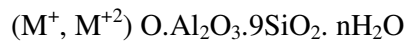
Biyokimyasal yollarla etanol üretiminde etkili mikrobiyal işlemler ve yüksek ürün derişimlerinin sağlanmasında, uygun mayanın, reaktör sisteminin ve fermentasyon ortamının seçimi önemli faktörlerdir.

Literatürde çeşitli mikroorganizmalarla fermentasyon yoluyla etanol üretiminde, substratları saflaştırmak ve etanol üretimini arttırmak amacıyla fermentasyon veya alıştırma ortamlarına maddeler eklenmiştir. Bu maddelerden biri, son zamanlarda iyon değışim, adsorplama ve katalitik özelliklerinden dolayı, substrat içinde bulunan ve fermentasyon mikroorganizmaları için zehirleyici etkisi olan eser elementlerin zararlı etkilerini azaltabilen zeolitlerdir.

### **2.9.1. Zeolitler**

"Zeolit" kelime olarak "Kaynayan taş" anlamındadır. Patlayarak dağılması nedeni ile bu isim verilmiştir.

Alkali ve toprak alkali metallerin kristal yapıya sahip sulu alümina silikatları olup çerçeve silikatlar grubundadır. İskelet yapılarındaki Si/Al oranlarındaki ve içerdikleri katyon cinsi ve miktarlarındaki bazı farklılıklara rağmen;



genel formülü ile ifade edilebilirler. Burada  $M^+$  bir alkali katyon olup genellikle  $Na^+$  veya  $K^+$ , nadiren de  $Li^+$  olur.  $M^{2+}$  ise bir toprak alkali katyondur ve genellikle  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  nadiren  $Ba^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  olur.

Herhangi bir zeolit kristalinin en küçük yapı birimi  $SiO_4$  veya  $AlO_4$  tetraederleridir. Si ve Al tetraederlerinin oluşturduğu birincil yapı ünitelerinin birleşmesi ile tek ve çift halkalı ikincil yapı üniteleri ve yüksek simetrik parametreler meydana gelir. Bu polieder ve ikincil yapı ünitelerinin üç boyutta değişik şekillerde dizilmesi ile de mikro gözeneklere sahip zeolit iskeleti ortaya çıkar. Poliederler ve bunları birbirine bağlayan ikincil yapı üniteleri arasında yer alan bu mikrogözenekler mikropencerelerle birleşip bir, iki veya üç boyutlu boşluk sistemleri ve/veya kanalları oluşturur. Boşluk miktarı toplam hacmin % 20'si ile % 50'si arasındadır. Zeolitminerallerinin en önemli özelliği; bu boşluklar ve bu boşluklara kolayca girebilen ve yer değiştirebilen sıvı ve gaz molekülleri ile toprak alkali iyonlardan ileri gelen "moleküler elek" olmasıdır.

Zeolitlerin başlıca fiziksel ve kimyasal özellikleri olan; iyon değişikliği yapabilme açık renkli olma, hafiflik, küçük kristallerin gözenek yapısı zeolitlerin çok çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılmalarına neden olmuştur.

İyon değiştiriminin miktarı "iyon değiştirme kapasitesi" (İDK) ile ifade edilmektedir. İDK'nın ölçüsü gram veya 100 gram zeolit başına değiştirilebilen mol sayıdır. Bazan mol sayısı yerine eşdeğer ağırlık da kullanılmaktadır. Çizelge 2.3'de bazı zeolitlerin iyon değiştirme kapasiteleri verilmiştir.

Bu çalışmada doğal zeolit klinoptilolit ve sentetik zeolit NaY'nin etanol üretimi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Çizelge 2.3. Bazı zeolitlerin iyon değiştirme kapasiteleri (İDK)

Zeolit Adı	Formülü	İDK (meq/g)
Klinoptilolit	(NaK <sub>3</sub> )(Al <sub>6</sub> Si <sub>40</sub> O <sub>96</sub> ).24H <sub>2</sub> O	2.16
Mordenit	(Na <sub>8</sub> )(Al <sub>8</sub> Si <sub>40</sub> O <sub>96</sub> ).24H <sub>2</sub> O	2.29
Erionit	(Na <sub>3</sub> Ca <sub>3</sub> K <sub>2</sub> )(Al <sub>9</sub> Si <sub>27</sub> O <sub>72</sub> ).27H <sub>2</sub> O	3.14
Filipsit	(Na <sub>5</sub> K <sub>6</sub> )(Al <sub>10</sub> Si <sub>22</sub> O <sub>64</sub> ).20H <sub>2</sub> O	3.87
Analsim	(Na <sub>16</sub> )(Al <sub>16</sub> Si <sub>32</sub> O <sub>96</sub> ).16H <sub>2</sub> O	4.54
Laumonit	(Ca <sub>4</sub> )(Al <sub>3</sub> Si <sub>16</sub> O <sub>48</sub> ).16H <sub>2</sub> O	4.25
Sentetik zeolit A	(Na <sub>12</sub> )(Al <sub>12</sub> Si <sub>12</sub> O <sub>48</sub> ).27H <sub>2</sub> O	5.48
Sentetik zeolit X	(Na <sub>86</sub> )(Al <sub>86</sub> Si <sub>106</sub> O <sub>384</sub> ).264H <sub>2</sub> O	4.73

Roque, R. ve arkadaşları çalışmalarında maya fermentasyonunun hızına doğal ve homoiyonik zeolitlerin katalitik etkisini incelemişlerdir. Mayanın ortama aşılanmasından sonra 5-10 gL<sup>-1</sup> zeolitın alkol fermentasyonunun hızını hem laboratuvarında hem de geniş ölçekli proseslerde arttırdığı belirlenmiştir[24].

Bauman ve arkadaşları, doğal zeolit klinoptilolitin *Yarrowia lipolytica* mayası içindeki sphingolipid metabolizma üzerine etkisini incelemişlerdir. Ayrıca biyokütle gelişimi sırasında zeolitın pH değişikliği kadar hücrenin şekline ve boyutlarına etkisini de incelemişlerdir. Elektron mikroskopuyla yapılan taramalarda zeolitın *Yarrowia lipolytica*'nın boyut ve şeklini etkilediği gözlenmiştir. Zeolit yokluğunda 0,7-2,7µm boyutunda ve oval şekilli olan hücrelerin zeolit varlığında yuvarlak ve daha geniş olduğu ve 1,3-2,9 µm boyutunda olduğu belirlenmiştir [25] .

Ergun, M. ve arkadaşları tarafından, amonyum formuna dönüştürülmüş zeolit X'in etanol üretimi üzerine etkileri, fermentasyon ve alıştırma ortamlarına ayrı ayrı eklenerek incelenmiştir. Deneyle, 3,72 gL<sup>-1</sup> *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizmasıyla ve litrede 100 g şeker olacak şekilde seyreltilmiş melasla gerçeleştirilmiştir. Ortamlara eklenen zeolitın fermentasyon ortamında daha etkili

olduğu ortaya çıkmıştır. Fermentasyonun 24. saatinde alınan örneklerde yapılan analizler sonucu, bu maddelerin fermentasyon ortamında alışırma ortamına oranla daha etkili oldukları ve en etkili maddenin Zeolit X olduğu ve bu maddenin  $8 \text{ gL}^{-1}$  miktarıyla etanol üretimini %53 oranında arttırdığı belirlenmiştir [26].

Sıvaraman H., Chanwadkar A., çalışmalarında, derişimi  $100\text{-}300 \text{ gL}^{-1}$  arasında değişen şeker içeren melas ortamında, sentetik zeolit silikatın, etanol üretimi üzerine etkisini incelemiştir. Fermentasyon  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  sıcaklıkta, başlangıç pH 4,5 değerinde ve 50 rpm hızında sallamalı su banyosunda, *Saccharomyces cerevisiae* mayası ile gerçekleştirilmiştir. Silikat derişimi  $1\text{-}40 \text{ gL}^{-1}$  arasında değiştirilerek deneyler yapılmıştır.  $1 \text{ gL}^{-1}$  ve  $20 \text{ gL}^{-1}$  silikalit derişimlerinde benzer sonuçlar elde edilmiş ve bu miktarlarında silikalit, etanol üretim hızını  $0,30 \text{ gg}^{-1}\text{s}^{-1}$  değerinden  $0,52 \text{ gg}^{-1}\text{s}^{-1}$  arttırmıştır. Bu etanol hızına ortamda 100 ve  $150 \text{ gL}^{-1}$  şeker varken ulaşılmış, artan şeker derişimlerinde etanol üretim hızı düşmüştür. Sonuç olarak, fermentasyon ortamına silikalit eklenmesi, fermentasyonu hızlandırmıştır (silikalit olmadığında 24 saatte tamamlanan fermentasyonun, ortamda silikalit bulunması durumunda 16 saatte tamamlanmıştır). Çalışmada, silikatın etanol üretimini hızlandırması, melas ortamındaki eser elementlerin inhibitör etkilerini, adsorplama veya iyon değiştirme özelliği ile azaltmış olabileceğinden örneğın melas içinde yüksek miktarda ve etanol üretimi üzerinde inhibisyon etkisi bulunan  $\text{Na}^+$  iyonlarının, zeolitteki  $\text{K}^+$  iyonuyla yer değiştirerek, zehirleyici etkisinin azalmasından bahsedilmiştir. Bir başka yorum olarak da, maya hücrelerinin silikalit içine immobilize olup fermentasyon aktivitelerinin artmış olabileceği öne sürülmüştür [27].

### 2.9.2. Killer

Kil teriminin geniş bir anlamı vardır. Hem bir kayaç terimi olarak, hem de tane boyu terimi olarak kullanılmaktadır. Kayaç olarak bozunma ürünleri için kullanılan bir terimdir. Killerin kimyasal analizleri; silisyum, alüminyum ve sudan oluştuklarını

göstermektedir. Demir, alkaliler ve alkali topraklarda değişik miktarlarda yer almaktadır.

Endüstride, cam sanayinde, seramik, kağıt, deterjan ve ilaç yapımında kullanılan killer, adsorplama ve iyon değiştirme gibi özelliklerinden dolayı, su tesislerinde, ev atık suları ağır metal arıtımında da kullanılmaktadır. Bazı killer örneğin yüksek yüzey alanına sahip olan sepiyolit sorptif, reolojik ve katalitik uygulamalarda yoğun olarak kullanılmaktadır.

Kil mineralleri oldukça esnektir ve suda genişleme özelliği gösterirler. İyon değiştirme, özellikle katyon değiştirme kapasiteleri yüksektir ve çeşitlerine göre değişir. Katyon değişim kapasitesi (KDK), mineralin değişim karmaşıklarındaki negatif elektrikli yükleri nötralize eden, kolaylıkla değişebilir durumda bulunan katyonların toplam miktarını gösterir ve 100 gram kuru kilde miliekivalent olarak ifade edilir.

Montmorillonit; minerallerin ve volkan külünün bozunmasıyla oluşan bir üründür ve çoğunlukla yarı kurak koşullar altında bulunan bataklıklarda ve lagünlerde oluşur.

Kristal yapı formülleri;

$(OH)_8Si_8 (Al_{3.34}.Na_{0.66})O_{20}$  şeklindedir.

Yapılarındaki değişebilir katyonlar, sodyum, potasyum, kalsiyum ve magnezyumdur.

Türkiye dünyada başlıca zeolit ve kil minerali rezervlerine sahip olmasına rağmen bu kaynakların biyoteknolojide kullanılması ile ilgili çok az çalışma yapılmıştır. Kil mineralleri daha çok Eskişehir-Sivrihisar ve Mihalicçık-Yunussemre yörelerinde görülürken, zeolit minerali Batı Anadolu Bölgesinde Balıkesir ili Bigadiç ilçesi başta olmak üzere bu bölgedeki yatakların rezervi yaklaşık 500 milyon ton olup, Orta Anadolu ile birlikte Türkiye'nin toplam zeolit ve kil minerali rezervi 4.5 milyar ton dur.



### 2.9.3. Vitaminler

Etanol üretimini artırmak için ortama konan maddelerden biri de vitaminlerdir. Vitaminler birçok kimyasal tepkimeye giren organik maddelerdir. İnsan ve hayvan hayatında önemli rol oynarlar. Vitaminler kendi başlarına enerji kaynağı değildir, fakat birçok biyolojik olay üzerinde katalizör etkisi yaparlar. Biotin, tiamin ve pantoneik asit başta olmak üzere vitaminler, maya hücresi içinde gerçekleşen karboksilasyon ve dekarboksilasyon reaksiyonlarını desteklemek ve hücre zarını korumak gibi özelliklerinden dolayı gerekli maddelerdir.

Alfenore ve arkadaşları [28], çalışmalarında, *Saccharomyces cerevisiae* mayası ile glikozlu ortamda, hazırladıkları vitamin karışımının (pantotenik asit+ nikotinik asit+ inositol+ tiamin+ biyotin+ para-aminobenzoik asit) değişen derişimlerinin etanol üretimine etkisini araştırmışlardır. Fermentasyon 20 L kapasiteli reaktörde sürekli sistemde, pH= 4 ve glikoz başlangıç değeri 100 gL<sup>-1</sup> şartlarında gerçekleştirilmiş ve fermentasyon boyunca karıştırma hızı, pH, sıcaklık ve çözünmüş oksijen miktarı kontrol altında tutulmuştur. Çalışma sonunda vitamin karışımının artan derişimleriyle sırasıyla, 126 gL<sup>-1</sup>, 135 gL<sup>-1</sup>ve 147 gL<sup>-1</sup> etanol miktarlarına ulaşılmıştır. En yüksek etanol üretim hızı da 9,5 gL<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir.

### 2.9.4. Adsorbanlar

Etanol üretimini artırmak için ortama konan maddelerden birtanesi de adsorban ailesinin en önemlilerinden biri olan aktif karbondur.

Aktif Karbon yeryüzünde en çok bileşik yapan elementtir. Karbon tüm organik bileşiklerde temel yapı taşlarının oluşumunu sağlar. Şu anda kullanılan adsorbanların en önemlisi, yüksek gözenekliliğe sahip aktif karbonlardır. Ticari olarak aktif karbonlar, odun, turba, linyit, kömür, mangal kömürü, kemik, Hindistan cevizi kabuğu, fındık kabuğu ve yağ ürünlerinden elde edilen karbonların çeşitli işlemlerden geçirilerek aktive edilmesiyle elde edilirler.

Aktif karbon, büyük kristal formu ve oldukça geniş iç gözenek yapısı ile karbonlu adsorbanlar ailesini tanımlamada kullanılan genel bir terimdir. Aktif karbonlar, insan sağlığına zararsız, kullanışlı ürünler olup, oldukça yüksek bir gözenekliliğe ve iç yüzey alanına sahiptirler. Aktif karbonlar, çözültideki molekül ve iyonları gözenekleri vasıtasıyla iç yüzeylerine doğru çekebilirler ve bu yüzden adsorban olarak adlandırılırlar.

Aktif karbonun iç yüzeyi (aktifleştirilmiş yüzey) çoğunlukla BET yüzeyi olarak ( $m^2g^{-1}$ ) ifade edilir. Yüzey alanı azot ( $N_2$ ) gazı kullanılarak ölçülür. Prensipte olarak, yüzey alanı ne kadar büyükse, adsorbsiyon merkezlerinin sayısının da o kadar büyük olduğu düşünülür.

Ikegami, T. ve arkadaşları *Saccharomyces cerevisiae* ile yapılan etanol fermentasyonuna çeşitli karbon maddelerini ekleyerek fermentasyona etkisini incelemişlerdir. 30 °C sıcaklıkta, 130 rpm çalkalama hızında ve  $100 gL^{-1}$  aktif karbon varlığında yapılan deneylerde üç farklı fermentasyon ortamı kullanılmış, aktif karbon eklenen ortamlarda glikoz tüketiminin ve etanol üretim hızının arttığı belirlenmiştir. Glikoz tüketiminin kontrol ortama göre 1,3 kat daha hızlı olduğu belirlenmiştir. Glikoz moleküllerinin aktif karbon yüzeyine adsorplanmasına rağmen mayalar etanol üretimini gerçekleştirmişlerdir. Etanol üretim hızının ise 1,1 daha hızlı olduğu gözlenmiştir [29].

Ikegami, T. ve arkadaşları, [30], çalışmalarında aktif karbonun kültür ortamına ilavesiyle mayanın gelişimi üzerine etkisini incelemişlerdir. *Candida krusei* IA-1 mayası kullanarak yapılan kesikli fermentasyonda lag (gecikme) fazı taze hazırlanmış ortamda 2 % w/v aktif karbon ilavesiyle bir saat daha kısalmıştır. Serbest hücre derişimi aktif karbon varlığında 108 hücre/mL iken aktif karbonun yokluğunda yalnızca 105 hücre/mL olarak belirlenmiştir.

## 2.10. Deneysel Tasarım Yöntemleri

Bu çalışmada Box-Wilson deneysel tasarım yöntemi kullanılmıştır.

### 2.10.1. Box-Wilson tasarımı

Box-Wilson tasarım yönteminde deney sonuçları bir model eşitliği ile ifade edilir. Bu yöntemin faydalı yanı endüstriyel boyuttaki uygulamalarda da kullanılabilmesidir. Faktörler uygun aralıkta seçilerek quadratik bir fonksiyonla ifade edilir. Yöntemde ilk basamak, bağımlı değişken (response) ile bağımsız değişkenler (factors) arasında uygun bir bağıntının oluşturulmasıdır. Örneğin  $x_1$  ve  $x_2$  değişkenlerinin değeri  $y$  değişkeninin verimini arttırmak üzere tasarlanacak olursa;

$$y = f(x_1, x_2) + \epsilon \quad (2.9)$$

$\epsilon$ :  $y$  için hata,  $x_1, x_2$  : bağımsız değişkenler

$$\eta = f(x_1, x_2)$$

$$E(y) = f(x_1, x_2) = \eta \quad (2.10)$$

$\eta$ : cevap yüzeyi

Eğer bağımlı değişken bağımsız değişkenlerce lineer (doğrusal) fonksiyonla tanımlanabiliyorsa, fonksiyon birinci merteye modelle tanımlanır.

$$Y = f(x) = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i<j}^3 \beta_{ij} X_i X_j + \epsilon \quad (2.11)$$

Eğer sistemde bir dönüm noktası varsa, daha yüksek mertebeden örneğin ikinci mertebeden (doğrusal olmayan) modelle tanımlanır.

$$Y = f(x) = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i<j}^3 \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \epsilon \quad (2.12)$$

Burada;

$y$ : bağımlı değişken,

$x_1, x_2, \dots, x_n$  : bağımlı değişken üzerinde etkili olan giriş değişkenleri

$i, j$ : 1'den değişken sayısı kadar değişir

$e$ : hata

$\beta_0$ : kayma

$\beta_i$  : doğrusal modelin katsayıları

$\beta_{ij}$ : karesel modelin katsayılarını göstermektedir.

Böylece, üç değişkenli bir problem için cevap fonksiyonu şöyle olacaktır.

$$Y=f(x)=\beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_4X_1^2 + \beta_5X_2^2 + \beta_6X_3^2 + \beta_7X_1X_2 + \beta_8X_1X_3 + \beta_9X_2X_3 \quad (2.13)$$

Doğrusal ve doğrusal olmayan modellerin parametrelerinin belirlenmesi optimal plan matrislerinin oluşturulmasıyla elde edilir. Plan matrisinde genel olarak parametrelerin kodlaştırılmış değerlerinden yararlanılır ve aşağıdaki eşitlikle ifade edilir.

$$U_i = \frac{X_i - X_{i0}}{\Delta X_i} \quad (2.14)$$

Burada  $U_i$  ; parametrelerin kodlaştırılmış değeri,

$X_{i0}$  ; parametrelerin ortalama değeri

$X_i$  ; parametrelerin gerçek değeri,

$\Delta X_i$  ; parametrelerin adım aralığıdır.

Burada faktörler (parametreler), önceden belirlenmiş seviyelerde değişir. Parametrelerin kodlaştırılmış değeri +1, 0 ve -1 olmak üzere üç seviyelidir. Burada (+1) yüksek seviyeyi, (-1) düşük seviyeyi ve (0) ise ortalama seviyeyi gösterir. Bu durum deney sonuçlarının boyutsuz şekilde işlenmesi imkanı sağlar. Plan matrislerinin kurulması aşağıdaki ardışıklıkla yapılır. Araştırma bölgesi ve merkezi plan seçilir. Koordinat başlangıcı oraya geçirilir. Daha sonra her bir faktör için

değişim aralığı seçilir. Planın merkezinin ve aralığın seçilmesi ancak deney yapanın tecrübesinden, araştırılan proseslerin tanımlanmasından ileri gelir. Deneysel hatayı belirlemek üzere ortalama seviyede deney boyunca üç ya da beş kez tekrar edilir. Üç faktörlü bir tasarım için plan matrisi Çizelge 2.4’de verilmiştir.

Bu yöntemin diğer yöntemlere göre üstünlüğü bütün parametrelerin değişimine aynı zamanda bakılabilmektedir. Geleneksel yöntemle yapılan deneysel araştırmalarda diğer parametrelerin sabit değerlerinde bir parametre değiştirilir ve bu da çok sayıda deney yapılmasını gerektirir.

Çizelge 2.4. Üç faktörlü tasarım için plan matrisi

Deney No	U <sub>1</sub>	U <sub>2</sub>	U <sub>3</sub>	Y
1	+1	+1	+1	Y <sub>1</sub>
2	+1	+1	-1	Y <sub>2</sub>
3	+1	-1	+1	Y <sub>3</sub>
4	+1	-1	-1	Y <sub>4</sub>
5	-1	+1	+1	Y <sub>5</sub>
6	-1	+1	-1	Y <sub>6</sub>
7	-1	-1	+1	Y <sub>7</sub>
8	-1	-1	-1	Y <sub>8</sub>
9	+α	0	0	Y <sub>9</sub>
10	-α	0	0	Y <sub>10</sub>
11	0	+α	0	Y <sub>11</sub>
12	0	-α	0	Y <sub>12</sub>
13	0	0	+α	Y <sub>13</sub>
14	0	0	-α	Y <sub>14</sub>
15	0	0	0	Y <sub>15</sub>
16	0	0	0	Y <sub>16</sub>
17	0	0	0	Y <sub>17</sub>
18	0	0	0	Y <sub>18</sub>
19	0	0	0	Y <sub>19</sub>
20	0	0	0	Y <sub>20</sub>

Regresyon modelinde hataların beklenen değeri sıfırdır. Regresyon modelinin performansı  $R^2$  ; Bağımsız değişken x'in regresyon modeli ile bağımlı değişken y'ine ne kadar açıklayabildiğini görmek için bir ölçüt olarak kullanılır.

Gerçekleştirilen tasarım yönteminde kullanılan model, ANOVA (Analysis of Variance) testi ile istatistiksel olarak değerlendirilir. Bu test, sistem için önerilen model ve hatanın serbestlik derecesi, karelerin toplamı ve karelerin oranını içerir .

SSE- Hata karelerinin toplamı

SSM- Model karelerinin toplamı

SST- Toplam hata karelerinin toplamı

MSM- Model karelerinin oranı

MSE- Hata karelerinin oranı

Çizelge 2.5'de ANOVA testinde kullanılan değerler verilmiştir.

Çizelge 2.5. ANOVA testinde kullanılan değerler

Kaynak	Serbestlik derecesi	Karelerin toplamı	Karelerin oranı	F
Model	$f_3$	SSM	$SSM/f_3$	MSM/MSE
Hata	$f_2$	SSE	$SSE/f_2$	
Toplam	$f_1$	SST	$SST/f_1$	

$$\text{Korelasyon katsayısı; } R^2 = \text{SSM} / \text{SST} \quad (2.15)$$

olarak ifade edilir.  $R^2$  , 1'e ne kadar yakınsa, regresyon o kadar anlamlıdır, belirleyicidir. Bu konuda bilimsel bir karar verebilmek için hipotez testi yapılır.

### 2.10.2. Hipotez testi

$H_0$ = Regresyon modelindeki her bir katsayının etkisi önemsizdir.

$H_1$ = Regresyon modelindeki her bir katsayının etkisi önemlidir.

Çoklu regresyon modelinin belirleyiciliğini test etmek için *F-test* kullanılır.

$$H_0 : \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_k = 0 \quad (2.16)$$

$H_a : \beta_i$  değerlerinden en az biri 0 değil.

$$\text{Test istatistiği : } F = \frac{MSR}{MSE} = \frac{SSM/k}{SSE/(n-k-1)} \quad (2.17)$$

$\alpha$ : Büyüklük derecesi

k: Regresyonda kullanılan bağımsız değişken sayısı.

p: Modeldeki terimin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını belirlemede kullanılan sayı.

$$F > F_{\alpha, k, (n-k-1)} \quad \Rightarrow \quad H_0 \text{ hipotezi reddedilir.}$$

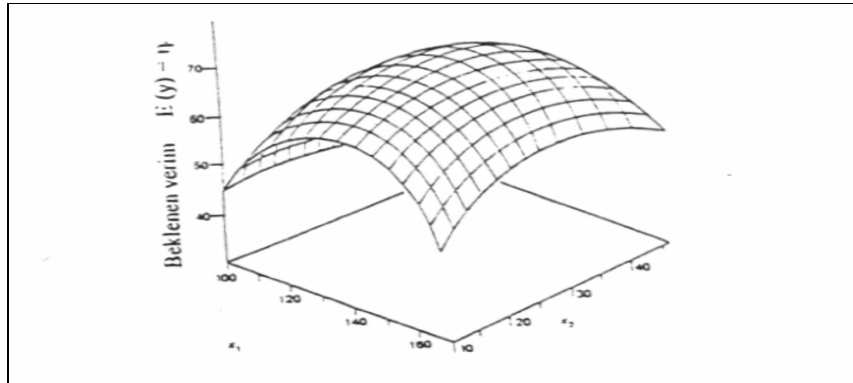
$$F \text{ değerine karşılık gelen } p\text{-değeri} < \alpha \quad \Rightarrow \quad H_0 \text{ hipotezi reddedilir.}$$

$p$ -değeri  $< \alpha$  ise  $H_0$  hipotezi reddedilir. Bu da, bağımsız değişkenlerle bağımlı değişken  $y$  arasında belirgin nitelikte bir ilişki olduğunu gösterir. Yani bağımsız değişkenler, bağımlı değişkeni etkileyen faktörlerdir. Testin reddedilmemesi ( $H_0$ 'ın kabul edilmesi) durumunda, bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkeni açıklayamadığı sonucu doğar. Bu durumda ya örnek sayısı artırılabilir veya bağımlı değişkeni etkileyebilecek yeni faktörler (bağımsız değişkenler) aranır .

Çalışmada, değişkenler arasındaki ilişkinin derecesinin saptanması, değişkenler arasındaki ilişkinin büyüklüğü ölçüsünde değişkenlerden biri hakkında bir bilgi edinildiğinde diğeri hakkında da bilgi elde edilmesine ve bir değişkenden yararlanılarak diğerin açıklanmasına olanak sağlar. İki değişken arasındaki ilişkinin saptanması bu iki değişkene ait ortak bir bilginin elde edilmesidir. Tek değişkenli varyans analizinin (ANOVA) modelleri, tek-yönlü, iki-yönlü, üç-yönlü, vb. şeklindedir. En basit anlamda tek-yönlü tek değişkenli varyans analizinde tek bağımsız değişken (faktör) ve tek bağımlı değişken yer almaktadır. Bağımlı değişken sayısı tek kalmak üzere, bağımsız değişken sayısı iki olduğunda iki-yönlü ANOVA olarak tanımlanır. Farklı iki değişken söz konusu olduğunda, değişkenlerin birbirlerine olan etkileri veya bağımsız olup olmadıkları da önemlidir. Bazı olaylarda değişkenler karşılıklı olarak birbirlerini etkilerler yani bağımsız değildirler.

### 2.10.3. Cevap yüzeyi metodu

Bir ya da daha fazla ölçülebilen değişkenle, girdi değişkenleri arasındaki regresyon modelinin deneysel olarak tanımlanması ve bu modele göre bağımsız değişkenin En yüksek ve minimum seviyeleri arasında bağımlı değişkenin cevap yüzeyinin incelenmesine dayanır. Cevap yüzeyi, Şekil 2.10 da görüldüğü gibi üç boyutlu bir alan olarak düşünülebilir.

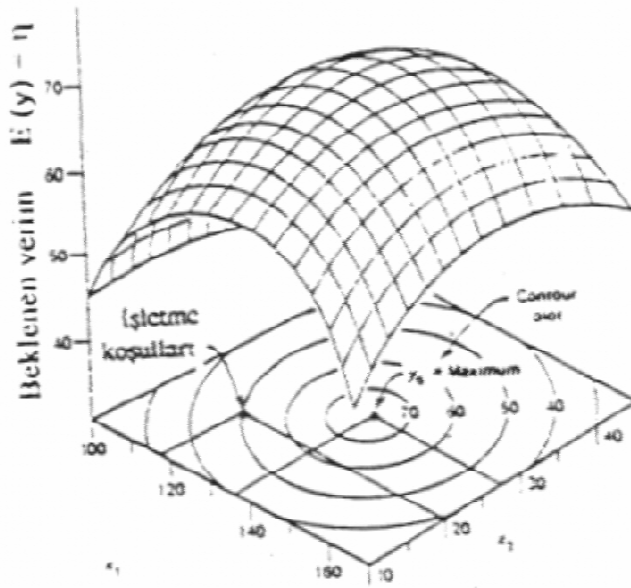


Şekil 2.10. Beklenen verimin  $x_1$  ve  $x_2$ 'nin fonksiyonu olarak üç boyutlu gösterimi [31]



Cevap yüzeyini daha rahat görmek üzere, sabit bağımlı değişkenin doğruları  $x_1$ ,  $x_2$  ekseninde çizilir ve buna kontur plot (contour plot) adı verilir (Şekil 2.10). Böylelikle  $x_1$  ve  $x_2$ 'nin cevap yüzeyinde meydana getirdiği değişiklik kolaylıkla anlaşılabilir.

Bir çok cevap yüzeyi metodu probleminde bağımsız değişkenler ile bağımlı değişkenler arasındaki ilişki bilinmez. Bunun için öncelikle bağımsız değişkenlerle bağımlı değişken arasında doğru fonksiyonel ilişkiyi tanımlamak üzere uygun yaklaşım yapılmalıdır. İstatistiksel modellerin kurulmasında doğrusal ve doğrusal olmayan regresyon denklemlerinin birinci ve ikinci dereceden polinomlarından yararlanır.



Şekil 2.11. Cevap yüzeyi için kontur plot [31]

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Mikroorganizmanın fermentasyonda kullanılabilmesi için üretilmesi gerektiğinden, liyofiliz halinden aktif hale geçirilen mikroorganizmanın eğik agarlı ortama ekilerek üremesi ve daha sonra agarlı ortamdan üreme ortamına aşıl原因an mikroorganizmanın sayısal olarak çoğalması sağlanır. Tekrarlanan deneylerde, her defasında, aynı miktarda mikroorganizma kullanabilmek için, literatürde belirlenmiş eksponansiyel bölgenin belirli zaman diliminde üreme ortamından alınan mikroorganizmalar yapay melastan oluşan fermentasyon ortamına aşılır [32]. Fermentasyon ortamına değişen derişimlerde maddeler (zeolit, kil, aktif karbon) eklenerek fermentasyon gerçekleştirilir. Fermentasyon süresince belli zamanlarda alınan numunelerde, pH, etanol derişimi analizleri yapılır ve ortama eklenen madde-etanol verimi etkileşimleri incelenir.

#### 3.1. Kültürleme

Üzerinde veya içinde mikroorganizma üretilmiş (ya da üremiş) besi yerine “kültür” denir. Mikroorganizmaların buldukları ortamdan belirli tekniklerle alınarak uygun bir besi yerine aktarılması ve burada gelişmelerinin sağlanmasına “kültürleme (kültivasyon)” denir. Kültürler genellikle buzdolabında (0-5 °C’de) muhafaza edilmektedir. Ayrıca kültürleri dondurarak (derin dondurucuda –20 °C, sıvı azot içinde –196 °C) donmuş halde veya liyofiliz stok kültürlerini hazırlayarak kuru halde, canlılık ve aktivitelerini yitirmeden uzun süre saklamak da mümkündür.

#### 3.2. Mikroorganizma ve Hazırlanışı

Çalışmada Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezinden alınmış, 251 TP(3-2) kod nolu *Sacharomyces cerevisiae* isimli mikroorganizma kullanılmıştır. Kullanılan mikroorganizma eğik agar ortamında muhafaza edilmiştir. Bu ortam; bir litrede 5g maya özütü, 20 g pepton, 20 g glikoz, 5 g malt özütü, 20 g agar içerecek şekilde hazırlanmış, tüplere aktarılmış ve daha sonra, 121 °C de 30 dk sterilize edilerek

tüpler hafif eğilerek ortamın eğik bir yüzey oluşturacak şekilde katılması sağlanmıştır. Mikroorganizma, sterilize edilmiş öze yardımıyla katılmış eğik agar ortamına ekildikten sonra inkübatörde 30 °C de 48 saat süreyle üremesi sağlanmış ve daha sonra fermentasyon ortamıyla aynı özellikleri taşıyan bir üreme ortamında sayısal olarak çoğalmaları sağlanmıştır.

### **3.3. Önaktifleştirme ve Üreme Ortamının Hazırlanışı**

Üremesi için gerekli ortama konmadan önce, mikroorganizmanın ortam koşullarına adaptasyonunun kolay olması için, bir litresinde 5 g maya özütü, 20 g pepton, 20 g glikoz, 5g malt özütü içeren sıvı ortam hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden, 5 ml tüp içine alınmış ve içine öze yardımıyla mikroorganizma konularak 1 gün 30 °C sıcaklıkta inkübatörde bekletilerek ön aktifleştirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Üreme ortamı ise, bir litrede 50 g glikoz, 12g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 5 g maya özütü, 0,5 g CaCl<sub>2</sub> içerecek , pH değeri 4,5 olacak şekilde hazırlanmış ve 121 °C’ de 30 dakika sterilizasyon yapılmıştır. Aktifleşme ortamında 1 gün bekleyen mikroorganizmanın, üreme ortamına eklenerek, 30 °C sıcaklıkta, 440 rpm karıştırma hızında manyetik karıştırıcıda üremeleri sağlanmıştır.

### **3.4. Üreme Eğrisinin Elde Edilmesi**

Fermentasyon ortamında aktifliği yüksek mikroorganizmaların kullanılması açısından üreme eğrisinin belirlenmesi önemli olduğu için çalışmamızda belli zaman aralıklarında üreme ortamından numuneler alınmış 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbansları okunmuş, mikroorganizma sayısındaki değişim izlenmiştir. Lambert- Beer kanunu gereğince absorpsiyon okumaları lineerliği sağlamak amacıyla 0,05-0,4 aralığında olmalıdır. Bu nedenle üreme eğrisi oluşturulurken fermentasyon ortamından alınan numunelerin absorbanslarını belirtilen aralıkta okuyabilmek için değişik seyreltme oranları uygulanmış ve üreme eğrisi, gerçek absorbans değerleri kullanılarak çizilmiştir.

### 3.5. Mikroorganizma Kuru Hücre Ağırlığının Belirlenmesi

Fermentasyon sırasında kullanılacak aşı mikroorganizma miktarının  $gL^{-1}$  olarak derişimini belirlemek amacıyla, üreme ortamından belirli zaman aralıklarıyla alınan örnekler ile kuru hücre ağırlığı belirlenir ve absorbans değerlerine karşı grafiğe geçirilir. Bu amaçla bölüm 3.3'de bileşimi verilen üreme ortamı hazırlanmış, pH değeri 4,5'e ayarlandıktan sonra, sıcaklığı 30 °C değerine ayarlı manyetik karıştırıcıya yerleştirilmiştir. Önceden boş ağırlıkları tartılmış olan tüplere, 10'uncu saatten itibaren 5 mL örnek alınmış ve aşağıda belirtilen işlem basamakları izlenmiştir.

- ✓ 5 ml'lik örnek içeren deney tüpleri 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
- ✓ Üstteki sulu kısım atılmış ve üzerlerine % 0,9'luk NaCl'den 5 mL ilave edilip tekrar 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- ✓ Üstteki kısım mikropipetle atılmış, tüpler 90 °C'de 20 saat süre ile kurutulmuştur.
- ✓ Sonra içinde  $CaCl_2$  olan bir desikatörde soğutulmuş, tüplerin ağırlıkları tartılmıştır.
- ✓ Elde edilen veriler, aşağıdaki eşitlikten yararlanılarak kuru hücre ağırlığı  $gL^{-1}$  biriminde belirlenmiştir.

$$X_{gL^{-1}} = (\text{Dolu tüp ağırlığı} - \text{Boş tüp ağırlığı}) * 10^3 / \text{Örnek hacmi}$$

### 3.6. Etanol Analizi

250 mL'lik erlenlerde, sallamalı su banyosunda ve 30 °C' de gerçekleştirilen fermentasyon ortamından 12., 16., 18., 24., 32. ve 36. saatlerde alınan örneklerde etanol analizi yapılmıştır.

#### 3.6.1. Etanol analizinde kullanılan belirteçler

1.  $K_2Cr_2O_7$  Çözeltisi

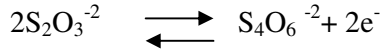
2. KI Kristalleri
3. 0,1 N Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O Çözeltisi.
4. %1 Nişasta Çözeltisi

Belirteçlerin hazırlanması ve dikkat edilecek hususlar

*K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> çözeltisinin hazırlanması*

10 g K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 600 mL saf suda çözüldükten sonra balon jøjeye aktarılmış, çözeltinin su eklenirken ısınması nedeniyle 400 mL derişik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> azar azar ilave edilerek 1000 mL'e tamamlanmıştır.

*Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O çözeltisinin hazırlanması*



Hava oksijenine karşı kararlı olan birkaç indirgenen biridir. Tiyosülfatın tetratiyonata kantitatif dönüşümü pH 7'den daha küçük pH'larda gerçekleşir.

Nişasta çözeltisi indikatör olarak kullanılır ve mümkünse kullanılacağı zaman taze olarak hazırlanmalıdır.

Nişasta, yüksek derişimlerde iyot içeren çözeltilerde, tersinmez şekilde bozunur. Bu yüzden yükseltgenlerin dolaylı tayini ile sodyum tiyosülfat ile yapılan iyot titrasyonunda nişasta ilavesi için, titrasyon nerdeyse tamamlanıncaya kadar yani rengin koyu kırmızımı kahverengiden açık sarıya değiştii ana kadar beklenir.

Parçalanma reaksiyonunu etkileyen faktörler;

- pH
- Mikroorganizmanın varlığı

- Çözeltinin derişimi
- Bakır(II) iyonlarının varlığı
- Güneş ışığı

Parçalanma reaksiyonunun hızı, çözeltinin asitliği arttıkça önemli ölçüde artar. Hafifçe bazik çözeltilerde tiyosülfat daha kararlıdır.

1 L damıtık su, saat camı ile kapatılmış beherde en az 5 dakika kaynatılıp, soğutulduktan sonra 25 g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ve 0,1 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  eklenmiştir. Çözelti homojen oluncaya kadar karıştırılmış ve sonra temiz, koyu renk bir şişeye aktarılıp karanlıkta saklanmıştır.

### 3.6.2. Etanol analizinin yapılışı

1. 0,5 mL analizi yapılacak örnek, rodajlı balonun içine konmuş, düzenekte soğutucunun altına yerleştirilen erlene de 25 mL  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  çözeltisi konmuştur. Sisteme buhar gönderilmiş ve toplam 50 mL örnek birikinceye kadar distilasyona devam edilmiştir.

2. 50 mL olan numune  $60^\circ\text{C}$ 'de su banyosunda 25 dakika bekletilmiş, erlen soğuduktan sonra 0,5- 1,0 g KI ilave edilip ve karanlıkta 5 dakika bekletilmiştir.

3. Bekletilmiş çözelti 0,1 N  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  çözeltisi ile titre edilmiştir. Titrasyonda açık sarı renk görüldüğünde %1'lik nişasta çözeltisinden yaklaşık 1 mL ilave edilmiştir. Böylece renk dönüşümü daha kolay gözlenmiştir. Titrasyona koyu mavi nişasta-iyot karışımının renginin Cr(III) iyonlarının açık mavi-yeşil rengine dönene kadar devam edilmiştir.

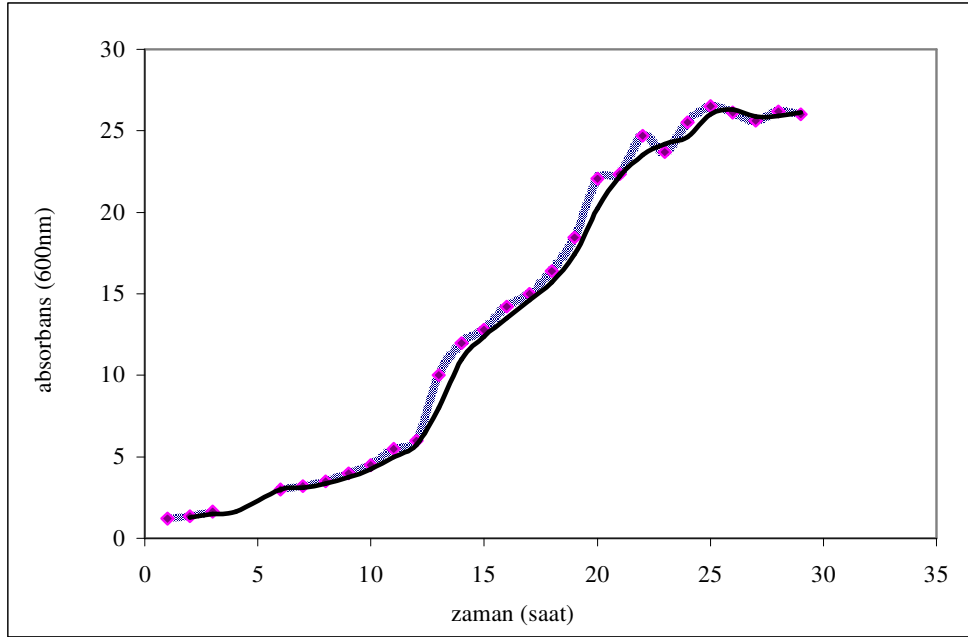
4. 25 ml  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  çözeltisi ve 25 mL saf su karışımına 0,5- 1,0 g KI konularak elde edilen şahit çözeltiliye de aynı işlemler uygulanmıştır.

#### 4. DENEY SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Fermentasyonla etanol üretiminde etanol veriminin artırılması adlı bu çalışmamız üç bölümden oluşmaktadır. Birinci bölümde literatürde etanol verimini arttırdığı bilinen zeolit NaY, montmorillonit (MNT) ve klinoptilolit (KLN)'nin etanol verimine etkisi değişen şeker derişimlerinde ( 200 gL<sup>-1</sup> ve 300 gL<sup>-1</sup> ) incelenmiştir. İkinci bölümde aktif karbon, talk ve bentonitin etanol verimine etkisi incelenmiştir. Üçüncü bölümde ise Box Wilson deneysel tasarım yöntemi kullanılarak Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> ve Mg<sup>2+</sup> iyonlarının etanol fermentasyonuna etkisi ve iyonlar arası etkileşim incelenmiştir.

##### 4.1. Üreme Eğrisinin Oluşturulması

Bölüm 3.3'de anlatıldığı şekilde *Saccharomyces cerevisiae* mayası için üreme eğrisi oluşturulmuştur. EK-1'de verilen veriler yardımıyla çizilen Şekil 4.1'de görüldüğü gibi tipik S tipi eğri elde edilmiştir.



Şekil 4.1. *Saccharomyces cerevisiae* mayası için üreme eğrisi

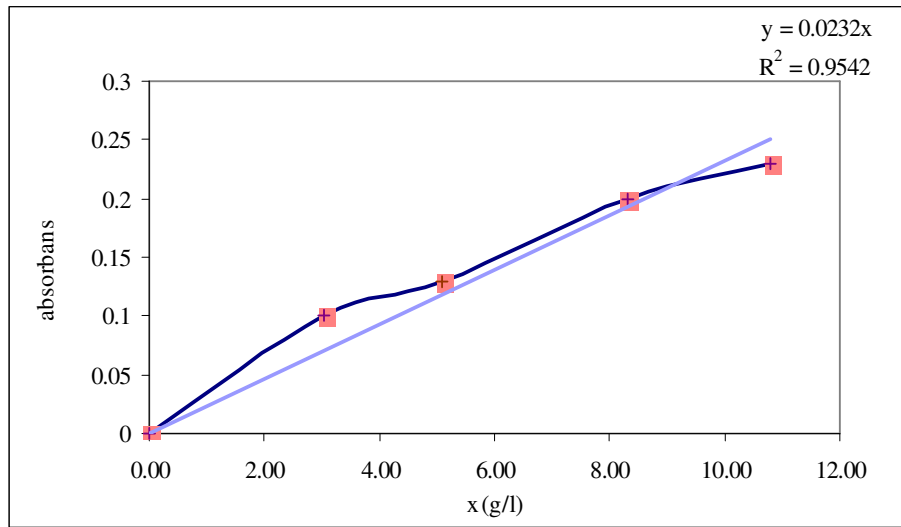
Şekil 4.1'den görüldüğü gibi logaritmik evre mikroorganizmanın üreme ortamına aşılmasından itibaren 13 ile 25. saat diliminde değişmektedir. Fermentasyon ortamında aktifliği yüksek mikroorganizma kullanmak için, üreme ortamından fermentasyon ortamına logaritmik evreye denk gelen bu zaman dilimi dahilinde, 19. saatte aşılama yapılmıştır.

#### 4.2. Kuru Hücre Ağırlığı Tayini Sonuçları

Kuru hücre ağırlığı tayini yapılırken, üreme ortamından, onuncu saatten itibaren belli aralıklarla numuneler alınmıştır. Zaman ilerledikçe üreme ortamının yoğunluğu arttığı için yine Lambert-Beer kanunu gereğince değişik seyreltme oranları uygulanarak 600 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. Elde edilen değerler Şekil 4.2'de grafiğe geçirilmiş ve bu grafikten absorbans ile kuru hücre ağırlığı arasındaki bağıntı aşağıdaki gibi bulunmuştur ( $R^2 = 0,9542$ ).

$$\text{Absorbans} = 2,315 * \text{Kuru ağırlık ( gL}^{-1}) \quad (4.1)$$

DeneySEL çalışma, mikroorganizma derişimi 1 gL<sup>-1</sup> olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.2. Absorbans-Kuru hücre ağırlığı kalibrasyon eğrisi



### 4.3. Ön Deneyleyler ile Uygun Fermentasyon Ortamının Belirlenmesi

Fermentasyon ortamına ekleyeceğimiz maddelerin, etanol derişimi ve üretim hızı üzerindeki etkilerini incelemek üzere yapılacak deneylerden önce, kullanılacak uygun fermentasyon çözeltilisi miktarı, çalkalama hızı, sıcaklık, pH gibi sistem parametreleri literatürden belirlenmiştir.

*Saccharomyces cerevisiae* mayası kullanılarak fermentasyon yoluyla etanol üretiminde etkisi olan ortam pH ve sıcaklığının uygun değerleri literatürde sırasıyla 4,5 ve 30°C olarak belirlenmiştir. Ancak, kullanılan mikroorganizmanın türüne göre, etanol üretimi açısından, uygun şeker derişimi ve oksijen ihtiyacı değişiklik gösterebilmektedir.

Tosun A., uygun fermentasyon ortamı miktarını belirlemek için yaptığı çalışmasında 30 °C sıcaklıkta, pH 4,5 değerinde, 100 rpm çalkalama hızında, 250 ml lik erlenlerde ve mikroorganizma derişimi 1 gL<sup>-1</sup> olacak şekilde sakkaroz içeren bir fermentasyon ortamı hazırlanmış ve belirli zaman aralıklarında alınan örneklerin etanol analizlerini yapmıştır. En yüksek etanol derişimine fermentasyonun 32. saatinde, 200 mL'lik çözeltiliyle 4,6 vv<sup>-1</sup> ve 150 mL'lik çözeltiliyle 4,5 vv<sup>-1</sup> değerlerine ulaşılmıştır. Çözelti hacmi 150 mL'den 200 mL'ye çıkartıldığında, etanol derişiminde önemli ölçüde bir artış gözlenmemiştir. Ayrıca, 100 mL'lik çözelti hacmiyle yaklaşık bu derişim değerine daha kısa sürede ulaşılmıştır (0,175 vv<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>). Çalışılan bu değerler arasında üretim hızının yüksek olması göz önünde bulundurularak, 100 mL' lik çözeltinin uygun fermentasyon hacmi olduğuna karar verilmiştir [32].

Tosun A., fermentasyonun çalkalama hızını belirlemek için yaptığı deneylerde 100 gL<sup>-1</sup> sakkaroz – 150 rpm çalkalama hızı şartlarında yirmidört saat sonra en iyi teorik verime (%80), otuziki saat sonra en fazla biyokütle miktarına (14 gL<sup>-1</sup>) ve en hızlı biyokütle gelişimine ulaşmıştır[32].

Çalkalama hızı arttıkça, oksijen transfer hızı artmış, biyokütle artışı hızlanmıştır ve en yüksek etanol derişimine ulaşmak için geçen süre kısalmıştır. Çalkalama hızı azaldıkça teorik verim yüzdesi de düşmüştür .

Deneyler sırasında belirli zaman aralıklarında numuneler alınmış, elde edilen etanol yüzdesi ve üretim hızları, ortamın pH değişimi incelenmiştir.

Çalışmamız boyunca deneyler, 250 mL'lik erlenlerde, sıcaklık 30 °C, çalkalama hızı 135 rpm, başlangıç pH değeri 4,5 ve mikroorganizma derişimi 1 gL<sup>-1</sup> olacak şekilde yapılmıştır.

#### **4.4. Şeker Derişiminin Belirlenmesi**

Besiyerindeki şekerin, toplam ozmotik basıncı mayanın hücre içi ozmotik basıncından yüksek olduğunda, hücre içinden dışına doğru bir su çıkışı olur. Eğer su çıkışı fazla olursa mikroorganizma ölür.

Fermentasyonda oluşan etanol derişimini arttırmak üzere çalışmanın birinci bölümünde deneyler farklı şeker derişimlerinde (litrede 200 g ve 300 g) yapılmıştır. Kullanılan fermentasyon ortamı Ankara Şeker Fabrikası melas analizleri ve literatürden yararlanılarak hazırlanmıştır [32]. Bu ortamının sakkarozsuz içeriği Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı şeker derişimlerinde kullanılan optimum fermentasyon ortamı

Madde	Miktarı (gL <sup>-1</sup> )
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,000
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,900
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	27,500
CaCl <sub>2</sub>	2,800
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,030
FeSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	2,800
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,030
ZnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,008
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,002
Pepton	2,670
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,010
Pant. Asit	0,002
İnosit	0,025
Biotin	0,003
Tiamin	0,010

Literatürde etanol verimine olumlu etkisi olan NaY, MNT ve KLN, mikroorganizma için zehirleyici miktardaki metal iyonları azaltılmış ve mikroorganizma gelişimi için faydalı metal iyonları artırılmış fermentasyon ortamında değişen şeker derişimlerinde denenmiştir. Çizelge 4.1’de verilen fermentasyon ortamından çalışmanın bundan sonraki bölümlerinde optimum şartlar olarak bahsedilecektir.

#### 4.5. Fermentasyon Ortamına NaY Eklenmesi

Çalışmada, fermentasyon ortamına eklenen ve kimyasal içeriği Çizelge- 4.2’de verilmiş olan Aldrich marka NaY’nin, etanol yüzdesi, üretim hızı ve pH üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan NaY’nin içeriği

Bileşen	SiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	CaO	Na <sub>2</sub> O
% İçerik	63,80	22,90	0,13	0,38	13,00

Melasın bileşiminde bulunan eser elementlerin miktarları gözönünde bulundurularak ve yapılan literatür araştırmaları sonucu, ortama eklenmesi gereken NaY miktarı 5 ila 15 gL<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir [32].

Zeolitin yapısındaki su molekülleri genellikle 100-400 °C arasındaki dehidrasyon sonucunda yapıyı terkederler. Bu sıcaklıkta suyunu kaybeden zeolitik yapı iskeleti bozulmaz. Su moleküllerinin yapıdan uzaklaştırılması sonucu tüm hacmin yarısına varan oranlarda boşluk elde edilmesi mümkündür. Çalışmada kullanılan NaY, fermentasyon ortamına konmadan önce, fırında 170 °C’de 4 saat süreyle kurutulup desikatörde oda sıcaklığına soğutulmuştur.

##### 4.5.1. NaY’nin etanol üretimine etkisi

200 gL<sup>-1</sup> ve 300 gL<sup>-1</sup> sakkaroz içeren fermentasyon ortamlarında değişen miktarlarda NaY eklenmesiyle elde edilen etanol derişimi- zaman değerleri sırasıyla Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4’de verilmiştir.

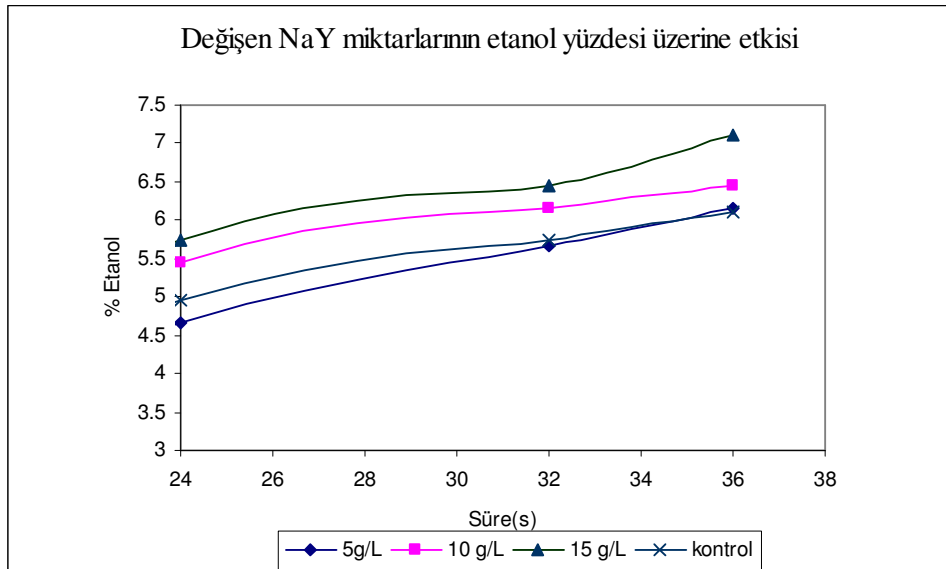
En yüksek etanol derişimine (EYED) ulaşmak için geçen süre litrede 300 g sakkaroz varken 36 saattir ve kontrol kültürle % 41 değerine ulaşan teorik verim yüzdesi ve 15 g NaY’nin ortamda bulunmasıyla % 47 değerine ulaşmıştır. Litrede 15 g NaY

varlığında en yüksek etanol verimine ve üretim hızına ulaşılmıştır. Üretim hızı ise kontrol ortamda  $0,17 \text{ vv}^{-1}\text{s}^{-1}$  iken  $15 \text{ gL}^{-1}$  NaY varlığında  $0,20 \text{ vv}^{-1}\text{s}^{-1}$ 'ye yükselerek %18 oranında artış göstermiştir.

Üretim hızı, en yüksek etanol derişiminin, en yüksek etanol derişimine ulaşmak için geçen süreye bölünmesiyle elde edilmiştir.

Çizelge 4.3.  $300 \text{ gL}^{-1}$  sakaroz içeren fermentasyon ortamına değişen miktarlarda NaY eklenmesiyle elde edilen sonuçlar

Parametre	NaY miktarı ( $\text{gL}^{-1}$ )			
	0,00	5,00	10,00	15,00
EYED, $\text{vv}^{-1}$	6,10	6,16	6,44	7,10
EYED için geçen süre, s	36,00	36,00	36,00	36,00
Üretim hızı, $\text{gL}^{-1}\text{s}^{-1}$	0,17	0,17	0,18	0,20
Teorik verim, %	41,00	41,00	43,00	47,00

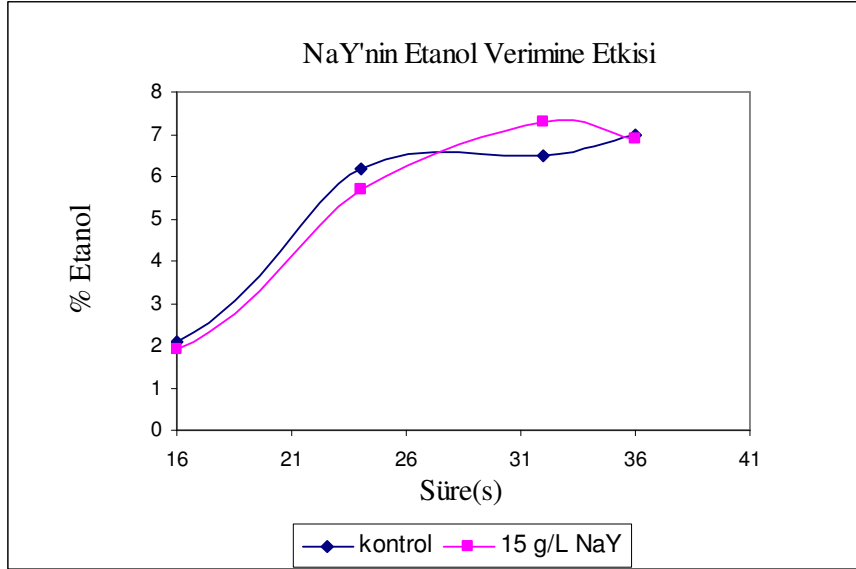


Şekil 4.3. NaY'nin  $300 \text{ gL}^{-1}$  şeker içeren fermentasyon ortamına eklenmesiyle elde edilen etanol süre - zaman eğrileri

300 gL<sup>-1</sup> sakkaroz varlığında kontrol ortamında %15'e yakın alkol oluşması beklenirken en yüksek % 6,1 alkol oluşmuştur. Bu durum ortamda şeker derişiminin çok fazla olması nedeniyle biyokütle inhibisyonunun gerçekleşmiş olabileceği ile açıklanabilir. Bu nedenle 15 gL<sup>-1</sup> NaY, 200 gL<sup>-1</sup> şeker içeren fermentasyon ortamında da denenmiş sonuçlar Çizelge 4.3'de verilmiştir. Etanol yüzdesi- süre değerleri EK-3'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. 15 gL<sup>-1</sup> NaY'nin 200 gL<sup>-1</sup> şeker içeren fermentasyon ortamına eklenmesiyle elde edilen sonuçlar

Parametre	NaY miktarı (gL <sup>-1</sup> )	
	0,00	15,00
EYED, vv <sup>-1</sup>	7,00	7,30
EYED için geçen süre, s	36,00	32,00
Üretim hızı, gL <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	0,20	0,29
Teorik verim, %	70,00	73,00



Şekil 4.4. 15 gL<sup>-1</sup> NaY'nin 200 gL<sup>-1</sup> şeker içeren fermentasyon ortamına eklenmesiyle elde edilen etanol yüzdesi- süre eğrileri

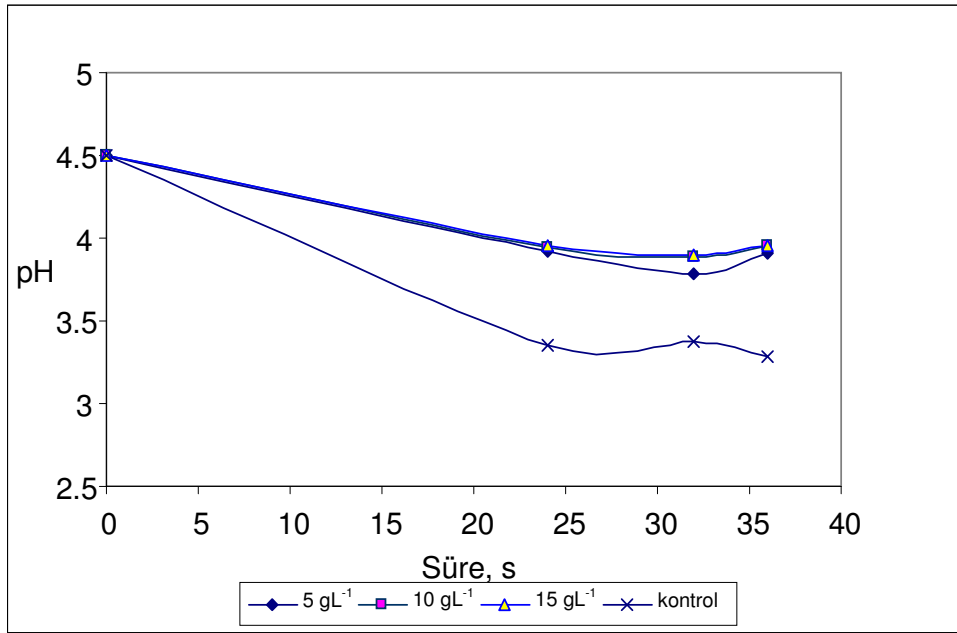
Çizelge 4.4 ve şekil 4.4'den görüldüğü gibi fermentasyon ortamında litrede 200 g şeker varlığında % 70 olan teorik verim 15 gL<sup>-1</sup> NaY ilavesiyle %73'e yükselmiştir. Üretim hızı ise % 45 oranında artış göstermiştir. Bu ortamda (200 g sakkaroz ) teorik verimde litrede 300 g sakkaroz oranla kontrol ortamda % 29 luk bir artış gözlenmiştir. 15 gL<sup>-1</sup> NaY'nin bu ortama ilave edilmesiyle teorik verim %70'den %73'e yükselmiştir. NaY'nin etkisi fermentasyon ortamı optimum şartlarda hazırlandığı için yeterince gözlenmiştir.

#### 4.5.2. NaY'nin ortamın pH değişimine etkisi

Fermentasyon sırasında etanolün yanısıra çok miktarda organik asitler de oluşur. Laktik asit, propiyonik asit, valerik ve bütirik asit bunlardan bazılarıdır. Bu organik asitler ortamda belli bir derişime ulaştığında pH değerinin düşmesine neden olurlar. *Saccharomyces cerevisiae* ile yapılan bir çalışmada laktik asit miktarının % 0,4 (w/v) ün üzerine çıktığında pH değerinin hücre aktivitesini olumsuz yönde etkilediği belirlenmiştir [33].

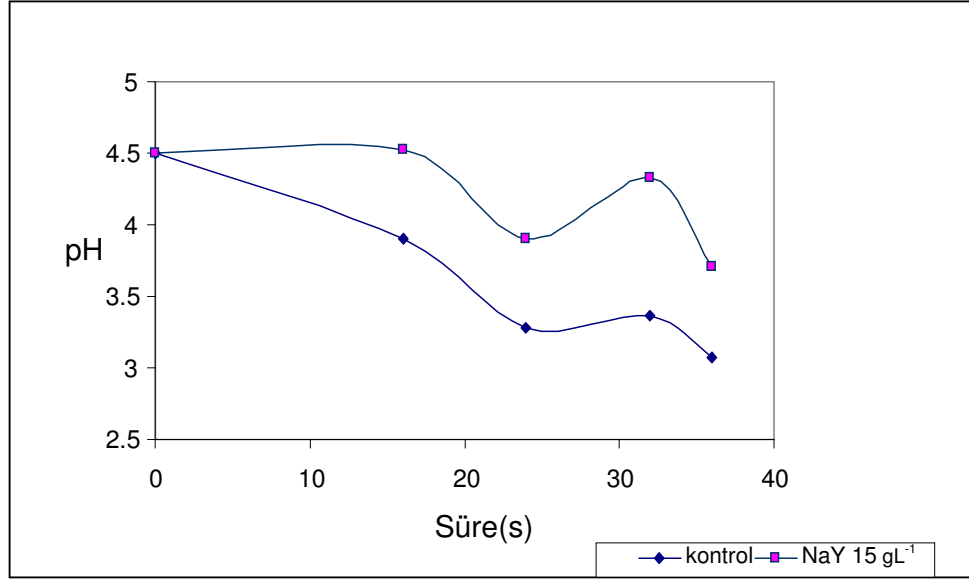
300 gL<sup>-1</sup> şeker içeren fermentasyon ortamında, fermentasyon boyunca elde edilen pH profili incelendiğinde (Şekil 4.5), kontrol kültürde 3,2 değerine düşen pH, 15 gL<sup>-1</sup> derişiminde NaY'nin ortamda bulunmasıyla 4 civarında sabit kalmıştır (EK-3). 200 gL<sup>-1</sup> şeker içeren fermentasyon ortamında ise kontrol kültürde 3,2 değerine düşen pH, 15 gL<sup>-1</sup> NaY'nin ortamda bulunmasıyla 3,7- 4,52 civarında değişmiştir. Şekil 4.6 incelendiğinde NaY varlığında pH daha düşük bir hızda azalmıştır. Etanol veriminin NaY varlığında kontrol ortama göre daha yüksek olmasını ortamın pH değerinin daha yüksek olmasıyla ilişkilendirebiliriz.

*Saccharomyces cerevisiae* mayasıyla etanol üretiminde optimum pH değerinin 4,25 olduğu belirlenmiştir [9]. Bu değerin 3,5'e düşmesi durumunda, fermentasyon performansının %50 ye kadar azalabileceği belirlenmiştir. Çalışmamızda da pH 3,5 değerinin altına düştüğünde etanol yüzdesinde azalma meydana gelmiştir.



Şekil 4.5. 300 gL<sup>-1</sup> şeker varlığında NaY içeren ortamlarda pH- süre eğrileri





Şekil 4.6. 200 gL<sup>-1</sup> şeker içeren fermentasyon ortamında 15 gL<sup>-1</sup> NaY varlığında pH- süre eğrileri

#### 4.6. Fermentasyon Ortamına Montmorillonit (MNT) Eklenmesi

Çalışmamızda kimyasal içeriği Çizelge 4.5’de verilmiş olan Edirne Lalapaşa ilçesinden gelen Ca-MNT kullanılmıştır. Ca-MNT’nin seçilme amacı, iyon değişim ve adsorpsiyon özelliğinin bilinmesidir.

Çizelge 4.5. MNT’nin kimyasal içeriği

Bileşen	SiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	MgO	CaO	Na <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> O
% İçerik	59,41	16,94	4,54	4,73	2,51	0,08	0,48

Kilin kation değişim kapasitesi (1,36 meq/g) ve şeker derişimi gözönünde bulundurulurken daha önceki çalışmalardan da yola çıkılarak fermentasyon ortamına eklenecek MNT miktarının 5 gL<sup>-1</sup> ile 15 gL<sup>-1</sup> arasında değiştirilmesinin uygun olacağı düşünülmüştür.

Çalışmada kullanılan MNT, fermentasyon ortamına konmadan önce, fırında 170 °C’de 4 saat süreyle kurutulup desikatörde oda sıcaklığına soğutulmuştur.

Deneyler sırasında belirli zaman aralıklarında numuneler alınmış, elde edilen etanol derişimi ve üretim hızları, ortamın pH değişimi incelenmiştir.

#### 4.6.1. MNT’nin etanol üretimine etkisi

300 gL<sup>-1</sup> şeker içeren fermentasyon ortamına 5 ile 15 gL<sup>-1</sup> aralığında değişen miktarlarda MNT’nin eklenmesi ile elde edilen etanol derişimi- süre değerleri EK-3’de verilmiştir. Bu değerlerden yararlanarak oluşturulan Çizelge 4.6 ve Şekil 4.7’den görüldüğü gibi, fermentasyon ortamına MNT’nin eklenmesi durumunda 36. saatte kontrol kültürle karşılaştırıldığında 10 gL<sup>-1</sup> MNT teorik verimi % 1,5 oranında arttırmıştır. Ancak fermentasyon ortamının optimum şartlarda hazırlanması sebebiyle bu artış çok fazla olmamıştır. Ayrıca 300 gL<sup>-1</sup> şeker içeren ortamda biyokütle inhibisyonu olmuş ve istenilen verim elde edilememiştir. Bu nedenle çalışmaya 200 gL<sup>-1</sup> şeker içeren fermentasyon ortamında etanol verimini en yüksek yapan 10 gL<sup>-1</sup> MNT varlığında devam edilmiştir.

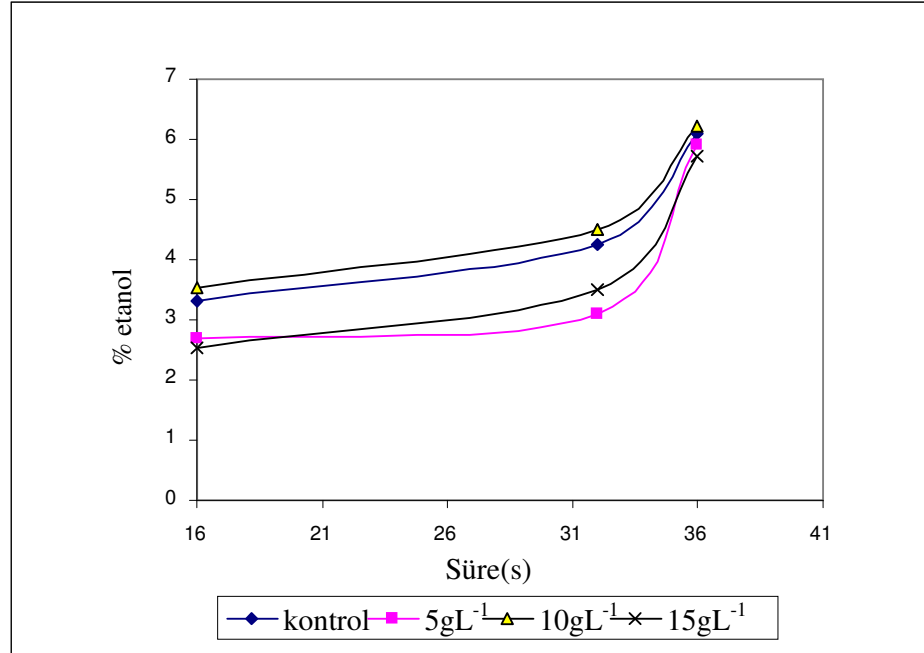
Çizelge 4.7’de görüldüğü gibi 10 gL<sup>-1</sup> MNT’nin 200 gL<sup>-1</sup> şeker içeren fermentasyon ortamına eklenmesiyle, en yüksek etanol derişimi artmış, bununla birlikte ortamda en yüksek derişime ulaşmak için geçen süre azalmıştır. Bu ortamda en yüksek değere ulaşmak için geçen süre kontrol kültürde 36 saat iken 10 gL<sup>-1</sup> MNT’nin eklenmesiyle bu süre 32 saate düşmüş, teorik verim %70’den % 72’e yükselmiştir (Şekil 4.8, EK-3). Etanol üretim hızı % 16 oranında artmıştır.

MNT’nin yapısındaki Ca iyonlarının, ortamda mikroorganizma için yüksek derişimleri, hücre solunumu ve dolayısıyla gelişimi üzerinde zararlı olan Zn ve Mn iyonlarının bir kısmıyla ve yüksek derişimleri glikoliz üzerinde zehirleyici etkisi olan Na iyonuyla yer değiştirerek, ortamdaki zehirleyici miktarlarını azalttığı ve Na derişimi değişiminin etkili olduğu yönündeki çalışmalardan [32] yola çıkarak

fermentasyon ortamında bu miktarlar azaltılmış ve dolayısıyla MNT'nin bu yöndeki olumlu etkileri belirgin biçimde gözlenememiştir.

Çizelge 4.6. 300 gL<sup>-1</sup> şeker içeren ortamda MNT'nin değişen derişimlerinin fermentasyon ortamına eklenmesiyle elde edilen sonuçlar

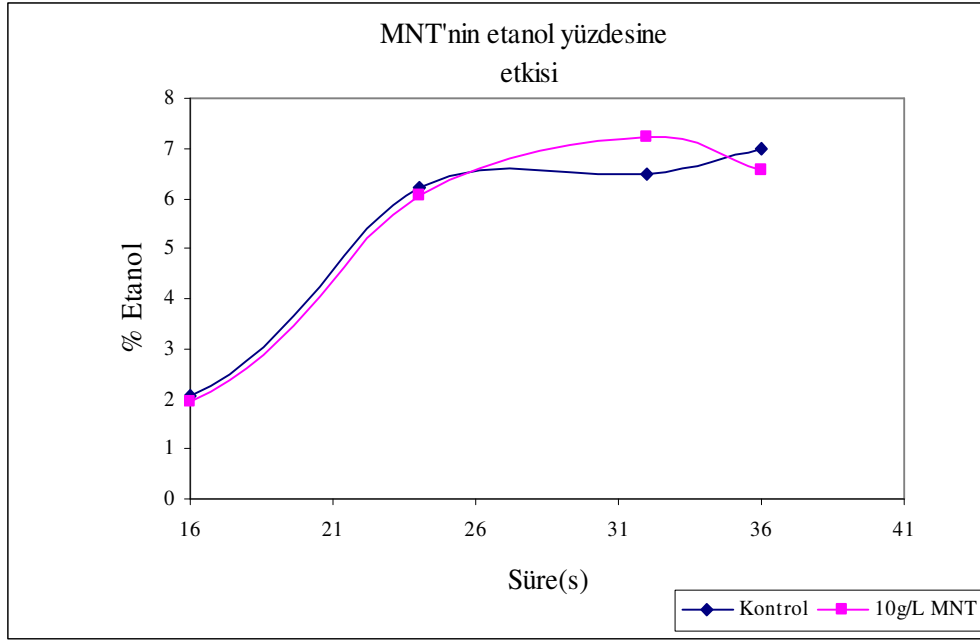
Parametre	MNT miktarı ( gL <sup>-1</sup> )			
	0,00	5,00	10,00	15,00
EYED, vv <sup>-1</sup>	6,10	5,92	6,20	5,72
EYED için geçen süre, s	36,00	36,00	36,00	36,00
Üretim hızı, gL <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	0,17	0,16	0,17	0,16
Teorik verim, %	41,00	39,00	41,50	38,00



Şekil 4.7. 10 MNT'nin 300 gL<sup>-1</sup> şeker fermentasyon ortamına eklenmesiyle elde edilen etanol yüzdesi- süre eğrileri

Çizelge 4.7. 200 gL<sup>-1</sup> şeker içeren fermentasyon ortamına 10 gL<sup>-1</sup> MNT eklenmesi ile elde edilen sonuçlar

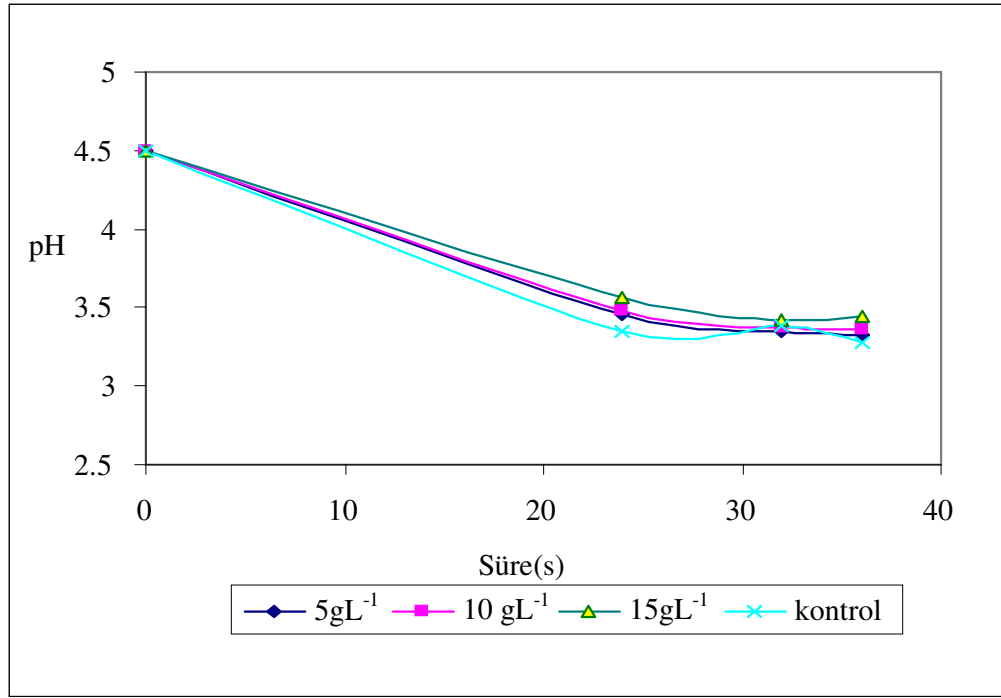
Parametre	MNT miktarı ( gL <sup>-1</sup> )	
	0,00	10,00
EYED, vv <sup>-1</sup>	7,00	7,22
EYED için geçen süre, s	36,00	32,00
Üretim hızı, gL <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	0,20	0,23
Teorik verim, %	70,00	72,00



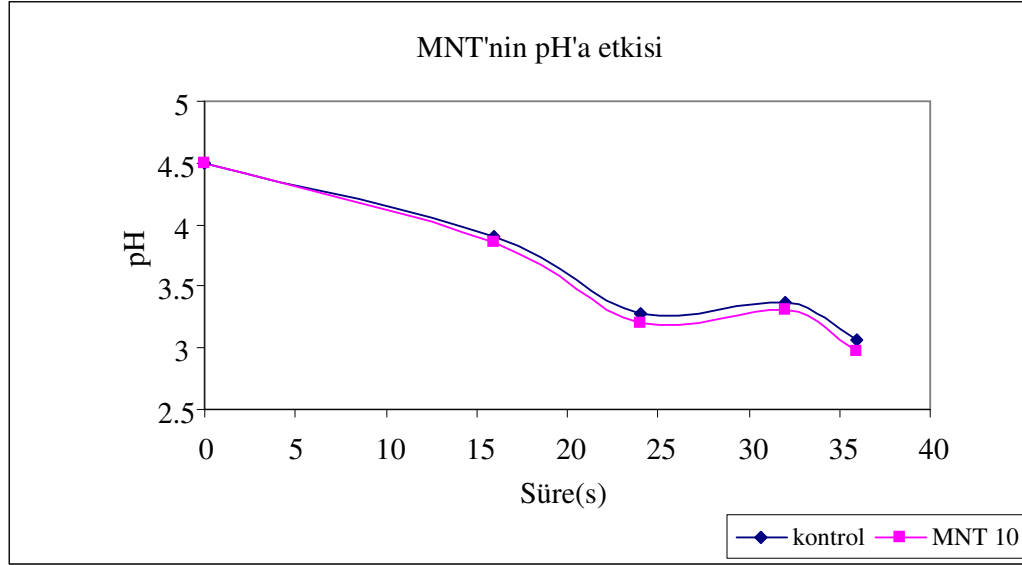
Şekil 4.8. 200 gL<sup>-1</sup> şeker içeren fermentasyon ortamına 10 gL<sup>-1</sup> MNT'nin eklenmesiyle elde edilen etanol yüzdesi- süre eğrileri

#### 4.6.2. MNT'nin ortamın pH değişimine etkisi

Fermentasyon boyunca elde edilen pH değişimi incelendiğinde (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8 ) fermentasyon ortamına MNT'nin eklenmesiyle kontrol ortama göre değişim gözlenmemiştir (EK-3).



Şekil 4.9. 300 gL<sup>-1</sup> şeker içeren fermentasyon ortamına MNT eklenmesiyle elde edilen pH- süre grafiği



Şekil 4.10. 200 gL<sup>-1</sup> şeker içeren fermentasyon ortamına MNT eklenmesiyle elde edilen pH- süre grafiği

#### 4.7. Fermentasyon Ortamına Klinoptilolit (KLN) Eklenmesi

Birim hücre formülü  $(Na_3,K_3)(Al_6,Si_{30}O_{72}).24H_2O$ , olan %77 KLN'nin ana mineralinin yanında kuvars, tridimit, serisit, kalsit olan ve Edirne'nin Enez ilçesinden gelen doğal zeolitin, etanol derişimi üzerindeki etkisi optimum şartlardaki fermentasyon ortamında incelenmiştir.

Zeolitin yapısındaki su molekülleri genellikle 100-400 °C arasındaki dehidrasyon sonucunda yapıyı terkederler. Çalışmada kullanılacak KLN, fermentasyon ortamına konmadan önce, fırında 170 °C'de 4 saat süreyle kurutulup desikatörde oda sıcaklığına soğutulmuştur.

Melasın bileşiminde bulunan eser elementlerin miktarları gözönünde bulundurularak ve yapılan literatür araştırmaları sonucu, ortama eklenmesi gereken uygun KLN miktarının 5 gL<sup>-1</sup> ila 15 gL<sup>-1</sup> olacağı düşünülmüştür [32]. Çalışmamızda KLN,

literatürden de yola çıkarak biyokütle gelişimini hızlandırmak amacıyla kullanılmıştır.

Literatürde *Saccharomyces cerevisiae*' nin zeolit içine immobilize olup, gelişiminin ve etanol üretim hızının arttığı üzerine sonuçlar elde edilmiştir.

KLN'nin yapılan literatür araştırmalarından [34], metal iyonlarını adsorplama ve iyon değiştirme özelliğinin olduğu belirlenmiştir. Kullanılan KLN'nin iyon değiştirme kapasitesi 4,25 meq/g dır. Bu çalışmada KLN, besiyeri ortamında bulunan ve mikroorganizma için zehirleyici etkisi olan iyonları ortamdaki uzaklaştırmak için kullanılmıştır.

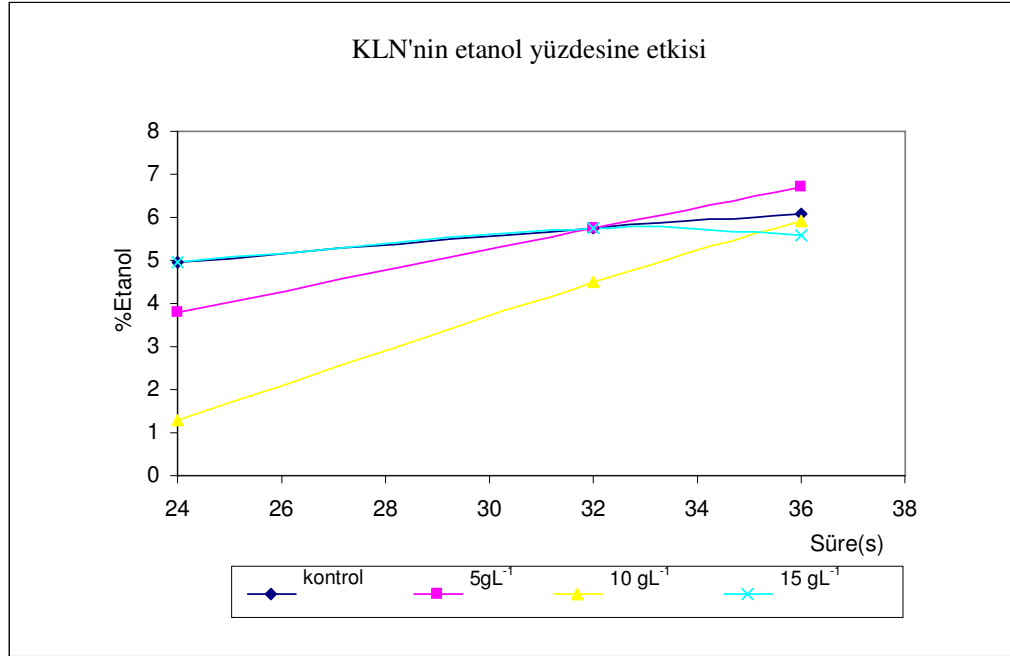
Deneyler sırasında belirli zaman aralıklarında numuneler alınmış, elde edilen etanol yüzdesi, üretim hızları ve ortamın pH değişimi incelenmiştir.

#### **4.7.1. KLN'nin etanol üretimine etkisi**

300 gL<sup>-1</sup> sakkaroz içeren fermentasyon ortamına 5-15 gL<sup>-1</sup> arasında değişen miktarlarda KLN'nin eklenmesi durumunda elde edilen etanol yüzdesi-süre değerleri EK-4 de verilmiştir. Çizelge 4.8'de görüldüğü gibi fermentasyon ortamına KLN'nin eklenmesi durumunda, artan derişimlerinde kontrol kültüre oranla teorik verimde önemli bir artış belirlenmemiştir. Ancak kontrol kültüre göre ortamda 5 gL<sup>-1</sup> KLN olduğunda etanol üretim hızı 0,17 değerinden 0,19 vv<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> değerine artış göstermiştir.

Çizelge 4.8. 300 gL<sup>-1</sup> sakkaroz içeren fermentasyon ortamına KLN'nin değişen miktarlarının eklenmesiyle elde edilen sonuçlar

Parametre	KLN miktarı ( gL <sup>-1</sup> )			
	0,00	5,00	10,00	15,00
EYED, vv <sup>-1</sup>	6,10	6,69	5,90	5,75
EYED için geçen süre, s	36,00	36,00	36,00	32,00
Üretim hızı, gL <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	0,17	0,19	0,16	0,18
Teorik verim, %	41,00	45,00	39,00	38,00



Şekil 4.11. 300 gL<sup>-1</sup> şeker varlığında KLN'nin değişen miktarlarında elde edilen etanol yüzdesi -süre eğrileri

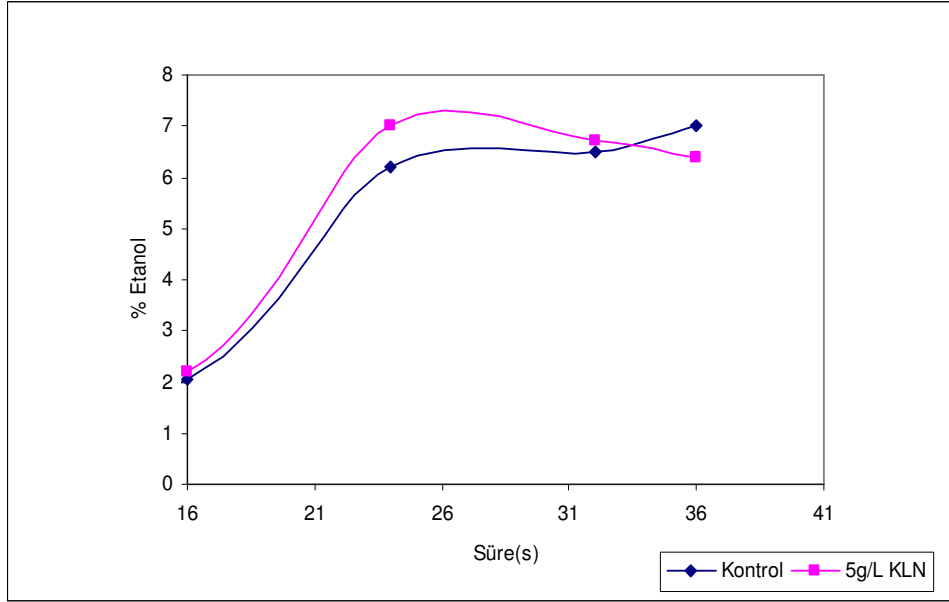


300 gL<sup>-1</sup> şeker içeren fermentasyon ortamında teorik verimi % 4 oranında arttıran 5 gL<sup>-1</sup> KLN, istenen verim alınmadığı için 200 gL<sup>-1</sup> şeker içeren fermentasyon ortamında da denenmiştir. Bu ortamda teorik verimi arttırmamış, kontrol kültürde % 70 olan teorik verim sabit kalmış, ancak kontrol kültürle 36. saatte ulaşılan en yüksek verime 5 gL<sup>-1</sup> KLN varlığında 24. saatte ulaşılmıştır. Üretim hızı 0,20 vv<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> dan 0,30 vv<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> 'a çıkmış yani %50 oranında artmıştır.

Literatürde KLN'in biyokütle gelişimi üzerine etkisi incelenmiş [32] ortama artan derişimlerde KLN ilave edildiğinde biyokütle miktarı azalmış ancak gelişimi hızlanmıştır. KLN'in üretim hızı üzerindeki olumlu etkileri bu sonuçla ilişkilendirilebilir.

Çizelge 4.9. 200 gL<sup>-1</sup> şeker içeren fermentasyon ortamına 5 gL<sup>-1</sup> KLN ilavesiyle elde edilen sonuçlar

Parametre	KLN miktarı ( gL <sup>-1</sup> )	
	0,00	5,00
EYED, vv <sup>-1</sup>	7,00	7,00
EYED için geçen süre, s	36,00	24,00
Üretim hızı, gL <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	0,20	0,30
Teorik verim, %	70,00	70,00

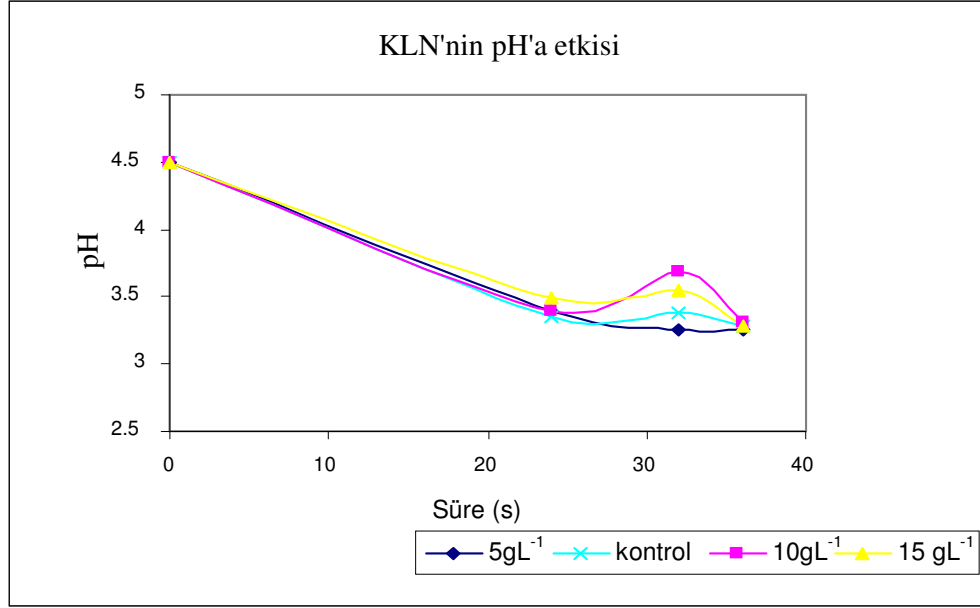


Şekil 4.12. 200 gL<sup>-1</sup> şeker içeren fermentasyon ortamına 5 gL<sup>-1</sup> KLN ilavesiyle elde edilen etanol yüzdesi- süre eğrileri

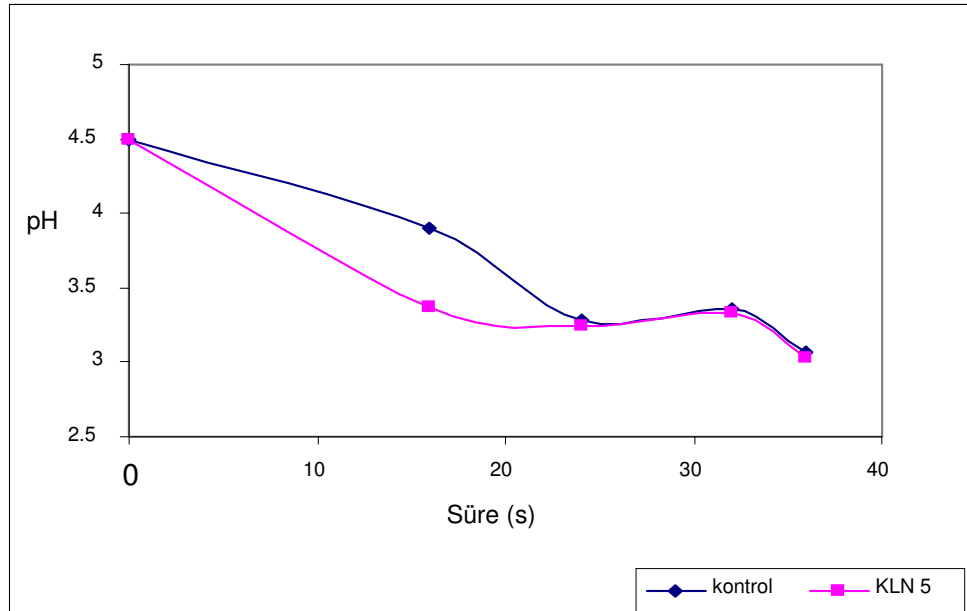
Literatür çalışmalarından da yola çıkarak bu çalışmada etanol üretim hızının artmasının bir nedeni olarak, mikroorganizmanın zeolit içine tutuklanıp, zehirleyici etkilerden daha az zarar görmüş olduğu ve KLN'nin ortamda bulunmasıyla (adsorpsiyon ve iyon değiştirme özelliği sayesinde) K dışındaki iyonların azalmasının (Zn, Mn ve Na) etanol üretim hızını arttıracak yönde etkilediği düşünülmüştür.

#### 4.7.2. KLN'nin ortamın pH değişimine etkisi

KLN'nin ortamda bulunmasıyla elde edilen pH profili, kontrol kültüre göre değişim göstermemiştir (Şekil 4.13, Şekil 4.14). pH değişimi zaman değerleri EK-4'de verilmiştir.



Şekil 4.13. 300 gL<sup>-1</sup> şeker içeren ortamda değişen miktarlarda KLN ilavesiyle elde edilen pH değişimi- süre grafiği



Şekil 4.14. 200 gL<sup>-1</sup> şeker içeren ortamda KLN'le elde edilen pH değişimi- süre grafiği

#### 4.8. Yapay Melas Ortamına Eklenen Maddeler

Çalışmamızın ikinci bölümünde  $100 \text{ gL}^{-1}$  şeker içeren yapay melas ortamında bentonit, talk ve aktif karbonun etanol yüzdesi, üretim hızı ve pH'a etkisi incelenmiştir.

Ankara Şeker Fabrikasının melas analizlerinden ve literatürden yola çıkarak yapay fermentasyon ortamı hazırlanmıştır [32].  $200 \text{ gL}^{-1}$  ve  $300 \text{ gL}^{-1}$  şeker içeren fermentasyon ortamında istenen verim elde edilemediği ve eklenen maddelerin etkisini daha iyi gözlemlemek için fermentasyon ortamı olarak  $100 \text{ gL}^{-1}$  şeker içeren yapay melas ortamı denenmiştir.

#### 4.9. Fermentasyon Ortamına Bentonit Eklenmesi

Büyük ölçüde montmorillonit veya montmorillonitten iyon değişimleri ile türemiş olan berdelit, saponit, hektorit ve nontronit gibi kil minerallerini içeren maddelere "bentonit" adı verilir. Jeolojik olarak, volkanik küllerin camsı yapısını kaybetmesi ile oluşan bentonitler içinde safsızlık olarak; kaolin ve illit gibi diğer kil mineralleri ile, jips, kuvars, rutil, kalsit, dolomit ve volkanik kül gibi kil minerali olmayan maddeler de bulunmaktadır. Bentonitin genel formülü  $\text{Al}_4\text{Si}_8\text{O}_{20}(\text{OH}) 4n\text{H}_2\text{O}$ 'dur. Ancak, oluşturucu mineral montmorillonitse, bu mineralin yapısında kalsiyum, sodyum ve magnezyum bulunur.

Bentonit meyve sularında fermentasyon sonrasında kötü kokuların ve mikroorganizmaların uzaklaştırılması için kullanılan bir takım kil minerallerini içeren bir maddedir. Bu çalışmada da bentonitin adsorplama, mayayı tutuklama özelliğinden yararlanılmak istenmiştir.

Çalışmamızda Riedel- de Haën marka ticari bentonit kullanılmıştır.

#### 4.9.1. Bentonitin etanol üretimine etkisi

Çalışmanın bu bölümünde  $100 \text{ gL}^{-1}$  şeker içeren yapay melas ortamına  $10 \text{ gL}^{-1}$  ve  $50 \text{ gL}^{-1}$ , bentonit eklenerek etanol derişimine etkisi incelenmiştir. Fermentasyon ortamı çizelge 4.10'da verilmiştir.

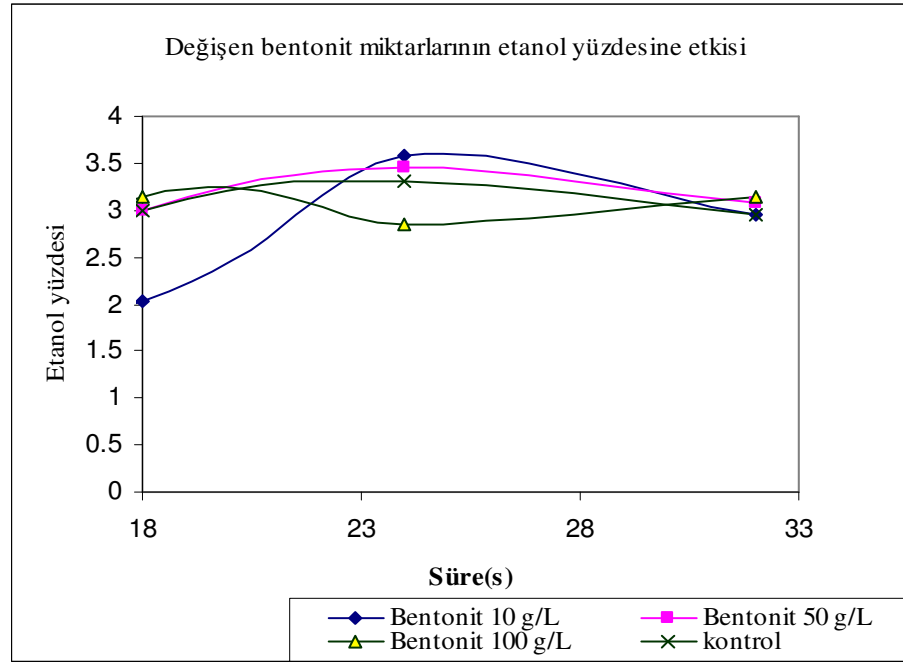
$100 \text{ gL}^{-1}$  şeker içeren fermentasyon ortamına değişen derişimlerde bentonit eklenmesi ile elde edilen etanol yüzdesi- süre değerleri EK-5'de verilmiştir. Bu değerlerden yararlanarak oluşturulan Çizelge 4.11 ve Şekil 4.15'den görüldüğü gibi, fermentasyon ortamına  $10 \text{ gL}^{-1}$  bentonitin eklenmesi durumunda en yüksek etanol derişimine 24. saatte ulaşılmıştır. Ortamda  $10 \text{ gL}^{-1}$  bentonit olması halinde teorik verim %66'dan %72'ye çıkmış, etanol yüzdesi %6 artmış fakat etanol üretim hızı azalmıştır.

Çizelge 4. 10. Çalışmada kullanılan yapay melas ortamı

Madde	Miktarı ( gL <sup>-1</sup> )
Sakkaroz	100,000
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,000
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,130
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25,993
CaCl <sub>2</sub>	2,800
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,709
FeSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,040
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,017
ZnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,021
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,002
Pepton	2,670
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,010
Pant. Asid	0,001
İnosit	0,125
Biotin	0,000125
Tiamin	0,005

Çizelge.4.11. 100 gL<sup>-1</sup> şeker içeren fermentasyon ortamına değişik derişimlerde bentonit eklenmesiyle elde edilen sonuçlar

Parametre	Bentonit miktarı ( gL <sup>-1</sup> )			
	0,00	10,00	50,00	100,00
EYED, vv <sup>-1</sup>	3,30	3,60	3,45	3,15
EYED için geçen süre, s	18,00	24,00	24,00	18,00
Üretim hızı, gL <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	0,20	0,15	0,14	0,18
Teorik verim, %	66,00	72,00	69,00	63,00

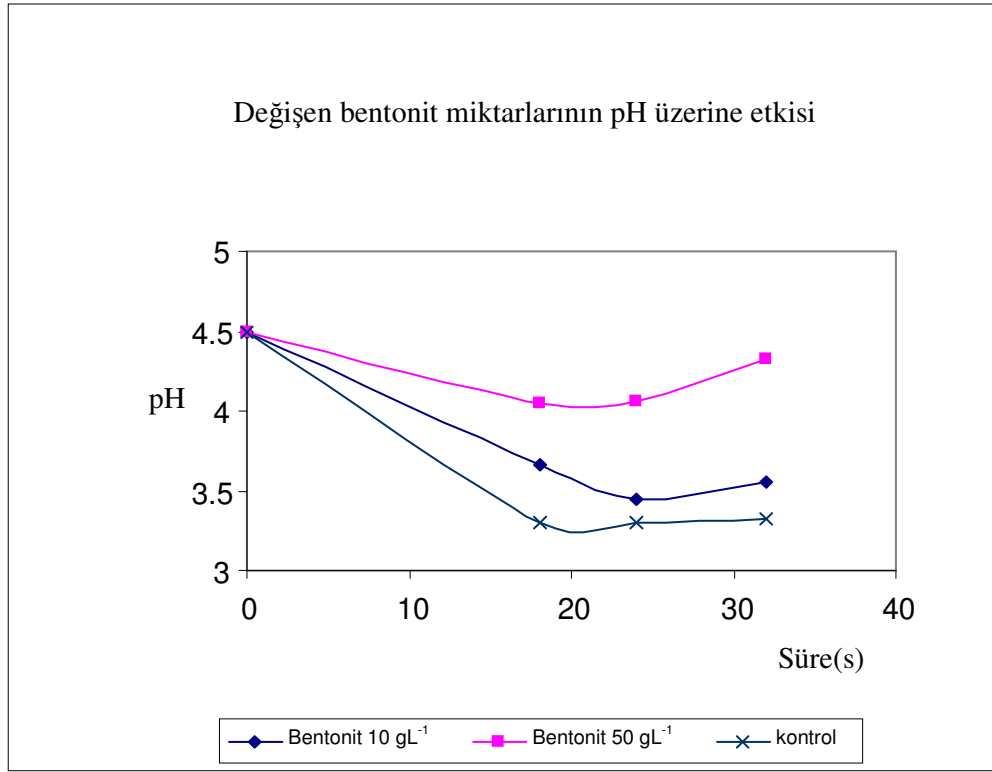


Şekil 4.15. Değişen bentonit miktarlarının etanol verimine etkisi

#### 4.9.2. Bentonit'in ortamın pH değişimine etkisi

Bentonit atık sularda Cd ve Zn iyonlarının uzaklaştırılması için kullanılan iyi bir adsorbandır [39]. Literatürde Cd ve Zn'nun adsorpsiyonunun çözeltinin pH'ına bağlı olduğu belirlenmiştir. Artan pH değerlerinde bu iyonların adsorpsiyonu da artar. Cd için uygun pH değeri 6,0, Zn için 6,5'dir. Bu çalışmadan yola çıkarak ortamda zehirleyici etkisi olan iyonları adsorbe edebileceği düşüncesiyle çalışmamızda bentonit kullanılmış fakat teorik verim yüzdesindeki artış beklenildiği gibi olmamıştır.

Bentonitin ortamda bulunmasıyla elde edilen pH profili, şekil 4.16'de verilmiştir. Değişik bentonit miktarları- pH değişimi değerleri EK-5'de verilmiştir.



Şekil 4.16. Değişen bentonit miktarlarının pH üzerine etkisi

Şekil 4.16'da görüldüğü gibi fermentasyon ortamına 50 gL<sup>-1</sup> bentonit ilavesiyle pH 4 civarında sabit kalmıştır. Bu sonuçtan yola çıkarak NaY'nin etanol verimini arttırmada sadece pH'ı sabitleme özelliğinin değil iyon değiştirme özelliğinin de etkili olduğu söylenebilir.

#### 4.10. Fermentasyon Ortamına Aktif Karbon Eklenmesi

##### 4.10.1. Aktif karbonun etanol üretimine etkisi

Önceki çalışmalardan da yola çıkılarak fermentasyon ortamına eklenecek aktif karbon miktarının 5 gL<sup>-1</sup> ile 100 gL<sup>-1</sup> arasında değiştirilmesinin uygun olacağı düşünülmüştür [29].



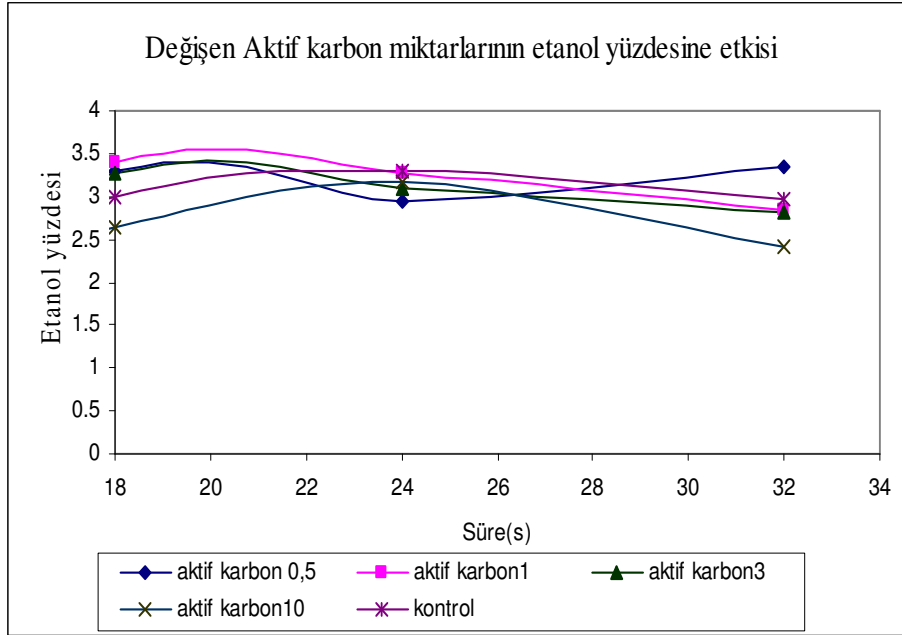
Çalışmada kullanılan aktif karbon, fermentasyon ortamına konmadan önce, fırında  $170^{\circ}\text{C}$ 'de 4 saat süreyle kurutulup desikatörde oda sıcaklığına soğutulmuştur.

Deneyler sırasında belirli zaman aralıklarında numuneler alınmış, elde edilen etanol yüzdesi ve etanol üretim hızları, ortamın pH değişimi incelenmiştir.

Aktif karbonun  $100\text{ gL}^{-1}$  şeker içeren yapay melas ortamına eklenmesiyle En yüksek etanol derişimi 18. saatte  $3,4\text{ v/v}$  olarak bulunmuştur. Etanol verimi- süre eğrileri EK-6'da verilmiştir. Kontrol kültürün 18. saatteki etanol verimi ise  $2,99\text{ vv}^{-1}$  bulunmuştur. Çizelge 4.12 ve şekil 4.17'den görüldüğü gibi bu deneyde en iyi sonuç ortamda  $10\text{ gL}^{-1}$  aktif karbon varlığında bulunmuş ayrıca fermentasyon hızı % 37 artmıştır, ancak alkol derişiminde önemli bir değişiklik görülmemiştir.

Çizelge 4.12. Aktif karbonun değişen derişimlerinin fermentasyon ortamına eklenmesiyle elde edilen sonuçlar

Parametre	Aktif Karbon miktarı ( $\text{gL}^{-1}$ )				
	0,00	5,00	10,00	30,00	100,00
EYED, $\text{vv}^{-1}$	3,30	3,34	3,40	3,27	3,17
EYED için geçen süre, s	24,00	32,00	18,00	18,00	24,00
Üretim hızı, $\text{gL}^{-1}\text{ s}^{-1}$	0,14	0,10	0,19	0,18	0,13
Teorik verim, %	66,00	67,00	68,00	65,00	63,00



Şekil 4.17. Değişen aktif karbon derişimlerinin fermentasyon ortamına eklenmesiyle elde edilen etanol yüzdesi- süre eğrileri

#### 4.10.2. Aktif karbonun ortamın pH değişimine etkisi

pH değişim-zaman değerleri EK-6'da verilmiştir. Fermentasyon ortamına Aktif karbonun eklenmesiyle kontrol ortama göre pH'da değişim gözlenmemiştir.

#### 4.11. Fermentasyon Ortamına Talk Eklenmesi

Talk; seramikte, boya yapımında, çatı kaplamasında, haşarat ilacı üretiminde, kauçuk ve kağıt sanayinde, kozmetik ve farmakolojide, asfalt dolgu maddesi yapımında, hayvan yemi ve gübre üretiminde kullanılır. Kullanım amacına göre, yumuşaklığı, yağ absorpsiyonu, nem oranı, erime noktası, özgül ağırlığı, ısı ve elektrik iletkenliği ve kimyasal analizi önemlidir.

Ortama eklenecek miktarlar  $10 \text{ gL}^{-1}$ ,  $50 \text{ gL}^{-1}$ ,  $100 \text{ gL}^{-1}$  olarak seçilmiştir.Çalışmada kullanılan talk, fermentasyon ortamına konmadan önce, fırında  $170^\circ \text{ C}$ 'de 4 saat süreyle kurutulup desikatörde oda sıcaklığına soğutulmuştur.

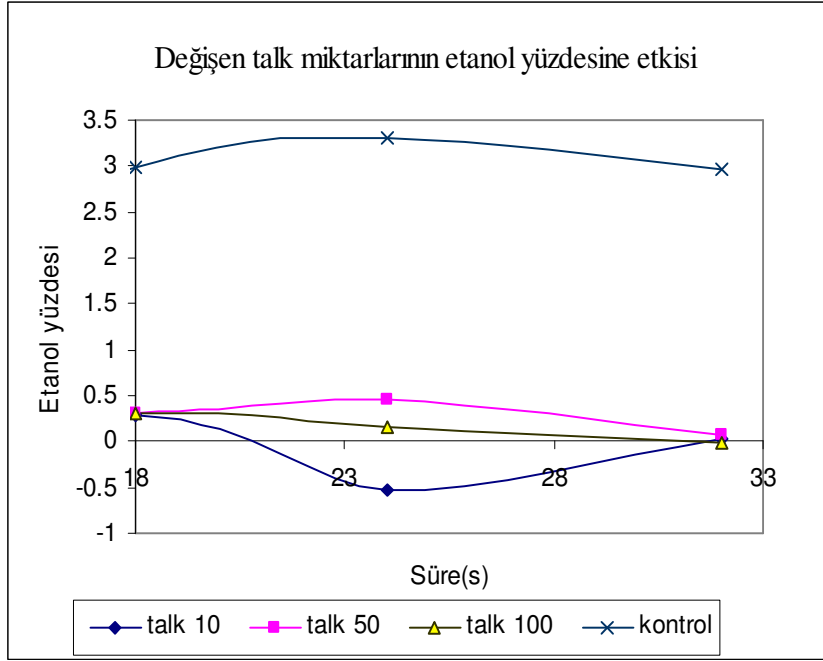
#### 4.11.1. Talk'un etanol üretimine etkisi

Talk'un 100 gL<sup>-1</sup> şeker içeren fermentasyon ortamına 10, 50, 100 gL<sup>-1</sup> olacak şekilde eklenmesiyle şekil 4.18 ve çizelge 4.13'den görüldüğü gibi fermentasyonu olumsuz yönde etkilediği gözlenmiştir. Etanol verimi- süre eğrileri EK-7'de verilmiştir.

Teorik verim kontrol kültürde % 66 iken talk ilavesiyle % 6 lara kadar düşmüştür.

Çizelge 4.13. Talk'un değişen derişimlerinin fermentasyon ortamına eklenmesiyle elde edilen sonuçlar

Parametre	Talk miktarı ( gL <sup>-1</sup> )			
	0,00	10,00	50,00	100,00
EYED, vv <sup>-1</sup>	3,30	0,28	0,46	0,30
EYED için geçen süre, s	24,00	18,00	24,00	18,00
Üretim hızı, gL <sup>-1</sup> s <sup>-</sup>	0,14	0,02	0,02	0,02
Teorik verim,%	66,00	6,00	9,00	6,00



Şekil 4.18. Değişen talk derişimlerinin fermentasyon ortamına eklenmesiyle elde edilen etanol yüzdesi- süre eğrileri

#### 4.12. Farklı Metal İyonu Derişimlerinin Etanol Verimi Üzerine Etkisi

Fermentasyon ortamında bulunan metal iyonlarının derişimi mikroorganizmalar için oldukça önemlidir. Bu değerler belli bir değer üzerinde olduğunda veya gerektiğinden az olduğunda mikroorganizmanın gelişimi ve fermentasyon aktivitesi olumsuz etkilenir. Literatürde, *Saccharomyces* türlerinin de belli metal iyonu derişimlerinde, hücre aktivitelerinin dolayısıyla fermentasyon özelliklerinin olumsuz yönde etkilendiği belirlenmiştir [35-36]. Çalışmanın bu bölümünde hazırlanan yapay melastaki miktarları da dikkate alınarak, Na, Ca, Mg iyonlarının değişen derişimlerinin kendi aralarındaki etkileşimlerinin, etanol verimi üzerine etkisini araştırmak üzere deneyler yapılmıştır.

Kullanacağımız metal derişimi aralığı Ankara Şeker Fabrikası melas analiz raporlarından (EK-6) yola çıkılarak belirlenmiş ve fermentasyon ortamında,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , NaOH ve  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  kullanılmıştır.

Çalışmada 100 gL<sup>-1</sup> şeker içeren yapay melas ortamı kullanılmıştır.

#### 4.12.1. Box-Wilson deneysel tasarım yönteminden yararlanarak fermentasyon ortamına Ca, Na ve Mg iyonlarının etkisinin araştırılması

Etanol üretiminin modellenmesinde yapılacak olan deneylerin koşullarını belirlemek üzere Box-Wilson deneysel tasarım yöntemi kullanılmıştır. Değişkenler Ca, derişimi (X<sub>1</sub>, mgL<sup>-1</sup>), Na derişimi (X<sub>2</sub>, mgL<sup>-1</sup>) ve Mg derişimi (X<sub>3</sub>, mgL<sup>-1</sup>)'dur. Etanol derişimi (Y, %vv<sup>-1</sup>) bağımlı değişken olarak seçilmiştir.

Hesaplamalar aşağıdaki eşitliğe göre düzenlenmiştir.

$$U_i = \frac{X_i - X_{i0}}{\Delta X_i} \quad (4.2)$$

Burada U<sub>i</sub>, i değişkeninin kodlanmış değeri; X<sub>i</sub>, i değişkeninin gerçek değeri ; X<sub>i0</sub>, i değişkeninin taranan alanın orta noktasındaki değeri ve ΔX<sub>i</sub> ise adım aralığıdır. α değeri üç faktörlü bir tasarım için (1.73) olarak alınmıştır [37]. Parametrelerin kodlanmış değerleri +1 , -1 ve 0'dır. Burada +1 yüksek seviyeyi, -1 düşük seviyeyi ve 0 değeri de orta seviyeyi gösterir. Değişkenlerin minimum ve en yüksek değerlerine, Türkiye'nin tümünde çıkarılan melas analizi sonuçları (EK-8) kullanılarak karar verilmiştir. Deneylerde Ca derişimi (X<sub>1</sub>); 680-2350 mgL<sup>-1</sup> arasında, Na derişimi (X<sub>2</sub>); 930-2900 mgL<sup>-1</sup> arasında ve Mg derişimi (X<sub>3</sub>) ise 56-200 mgL<sup>-1</sup> arasında değiştirilmiştir. Her bir bağımsız değişken için aşağıda verilen kodlanmış değer eşitlikleri kullanılarak gerçek değerler belirlenmiş ve bunlara karşı gelen gerçek değerler çizelge 4.14'de verilmiştir.

$$U_1 = (X_1 - 1515) / 835 \quad (4.3)$$

$$U_2 = (X_2 - 1915) / 985 \quad (4.4)$$

$$U_3 = (X_3 - 128) / 72 \quad (4.5)$$

Çizelge 4.14. Plan matrisindeki bağımsız değişkenlerin gerçek değerleri

Gerçek değerler	Kodlanmış değerler				
	- 1,73	- 1	0	+1	+1,73
X <sub>1</sub>	69	680	1515	2350	2961
X <sub>2</sub>	209	930	1915	2900	3621
X <sub>3</sub>	3,3	56	128	200	253

Çizelge 4.15' da Box-Wilson tasarım yöntemine göre 3 faktörlü plan matrisi görülmektedir. Bu matrise göre çalışma; yıldız noktasındaki ( $\alpha=1.73$ ) 6 deney ve merkez noktasındaki 6 deneyle beraber toplam 20 deneyden oluşmaktadır.

Çizelge 4.15. Parametrelerin kodlanmış ve gerçek değerleri ( $X_1$ =Ca,  $X_2$ =Na,  $X_3$ =Mg derişimi)

Deney No	Gerçek değerler			Kodlanmış değerler		
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$U_1$	$U_2$	$U_3$
1	2350	2900	200	+1	+1	+1
2	2350	2900	56	+1	+1	-1
3	2350	930	200	+1	-1	+1
4	2350	930	56	+1	-1	-1
5	680	2900	200	-1	+1	+1
6	680	2900	56	-1	+1	-1
7	680	930	200	-1	-1	+1
8	680	930	56	-1	-1	-1
9	2961	1915	128	$+\alpha$	0	0
10	69	1915	128	$-\alpha$	0	0
11	1515	3621	128	0	$+\alpha$	0
12	1515	209	128	0	$-\alpha$	0
13	1515	1915	252	0	0	$+\alpha$
14	1515	1915	4	0	0	$-\alpha$
15	1515	1915	128	0	0	0
16	1515	1915	128	0	0	0
17	1515	1915	128	0	0	0
18	1515	1915	128	0	0	0
19	1515	1915	128	0	0	0
20	1515	1915	128	0	0	0

Box-Wilson deneysel tasarım yöntemine göre 3 faktörlü tasarım yöntemi için öngörülen model aşağıdaki gibi olmalıdır. Bu modelde parametrelerin tek tek etkisi ve birbirleriyle olan etkileşimleri önemlidir. Deneysel verilerden yararlanarak katsayılar belirlenmiş, model eşitliği kodlanmış değerler cinsinden verilmiştir.

$$y=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_3+b_4X_1^2+b_5X_2^2+b_6X_3^2+b_7X_1X_2+b_8X_1X_3+b_9X_2X_3 \quad (4.6)$$

32. saatlerde alınan numunelerde etil alkol analizi yapılmış ve hesaplamalar çizelge 4.16'da verilen sonuçlara göre yapılmıştır.

Çizelge 4.16. Deneysel ve modelden hesaplanan etanol verim değerleri

Deney No	Deneysel EYED (vv <sup>-1</sup> )	Hesaplanan EYED (vv <sup>-1</sup> )
1	3,00	3,02
2	3,60	3,47
3	2,40	2,18
4	2,80	2,64
5	3,50	3,49
6	3,50	3,25
7	2,60	2,65
8	2,20	2,41
9	2,90	2,93
10	2,99	3,12
11	3,80	4,03
12	2,50	2,58
13	2,00	2,22
14	2,50	2,44
15	3,40	3,31
16	3,30	3,31
17	3,40	3,31
18	3,30	3,31
19	3,30	3,31
20	3,30	3,31

Anova testi sonuçlarından yararlanılarak hesaplanan korelasyon katsayısı (R<sup>2</sup> değeri) 0,96 olarak bulunmuştur. Bu sonuç, modelin sistemi iyi ifade ettiğini göstermektedir.

Çizelge 4.15'de verilen p değerleri modeldeki parametrelerin hangisinin daha etkili olduğunu göstermektedir. p, modeldeki terimin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını belirlemede kullanılan sayıdır. Büyüklük derecesi  $\alpha$  değerinin 0,05



alındığı programda,  $p < \alpha$  'ya sahip değere ait terim daha anlamlı hale gelir. Yani bu terimlerin bağımlı değişken etanol derişimini önemli ölçüde etkilediği belirlenmiş olur. Çizelgeden görüldüğü gibi a, c, e, s ve m katsayılarına ait terimlerin p değerleri  $< 0,05$  şeklindedir. Bu durumda tahmin edildiği gibi, deneylerde etanol derişimi üzerinde Ca, Na ve Mg iyonları derişimleri derişimleri etkili olmaktadır ( $p < 0,05$ ). p değerinin sıfıra yakın olması ilgili parametrenin bağımlı değişken üzerindeki etkisini daha anlamlı hale getirir. Bu durumda, metal iyonu derişimi derişiminin, üretilen etanol derişimi üzerine etkisi sırasıyla Na, Mg ve Ca iyonu derişimi şeklinde olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.19, şekil 4.20, şekil 4.21 incelendiğinde Na iyonunun azalan değerlerinde etanol verimi artmıştır. Ca derişiminin etanol verimine tek başına bir etkisi olmadığı, Na ve Mg iyonlarının derişimiyle verime etkisinin olduğu belirlenmiştir.  $Mg^{2+}$  iyonları Na iyonunun optimum değerinde Ca iyonlarına göre daha etkili olmuştur. Bu iyonlar arasında verime tek başına Na iyonları etkili olmuş, Mg ve Ca iyonlarının tek başına bir etkisinin olmadığı Ca: Mg oranının etanol veriminde etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.17. Quadratic model için bulunan denklem katsayıları  
( $X_1 = Ca$ ,  $X_2 = Na$ ,  $X_3 = Mg$ )

Katsayı	Katsayı		p değeri
<b>a</b>	4,67	-	0,0000
<b>b</b>	0,04	$X_1$	0,1977
<b>c</b>	2,45	$X_2$	0,0001
<b>d</b>	0,05	$X_3$	0,1449
<b>e</b>	0,15	$X_1^2$	0,0247
<b>g</b>	0,01	$X_2^2$	0,4493
<b>s</b>	1,71	$X_3^2$	0,0001
<b>n</b>	0,05	$X_1 * X_2$	0,1779
<b>m</b>	0,24	$X_1 * X_3$	0,0070
<b>z</b>	0,08	$X_2 * X_3$	0,0821

Bu katsayılar kullanılarak oluşturulan model eşitliği aşağıdaki gibidir.

$$Y = 4,67+0,04*X_1 +2,45*X_2 +0,54*X_3 +0,15*X_1^2+ 0,01* X_2^2+ 1,71*X_3^2 + 0,05*X_1X_2 + 0,24*X_1X_3+0,08X_2X_3 \quad (4.7)$$

Anova testi sonuçlarına göre,  $X_2$ ,  $X_1X_3$ ,  $X_1^2$ ,  $X_3^2$  terimlerinin p değerlerinin 0,05'den küçük olması nedeniyle modelde önemli olduğu belirlenmiş ve yukarıdaki denklem modifiye edilerek aşağıdaki hale getirilmiştir.

Çizelge 4.18. Modifiye edilen Quadratic model için bulunan denklem katsayıları  
( $X_1= Ca$ ,  $X_2=Na$ ,  $X_3= Mg$ )

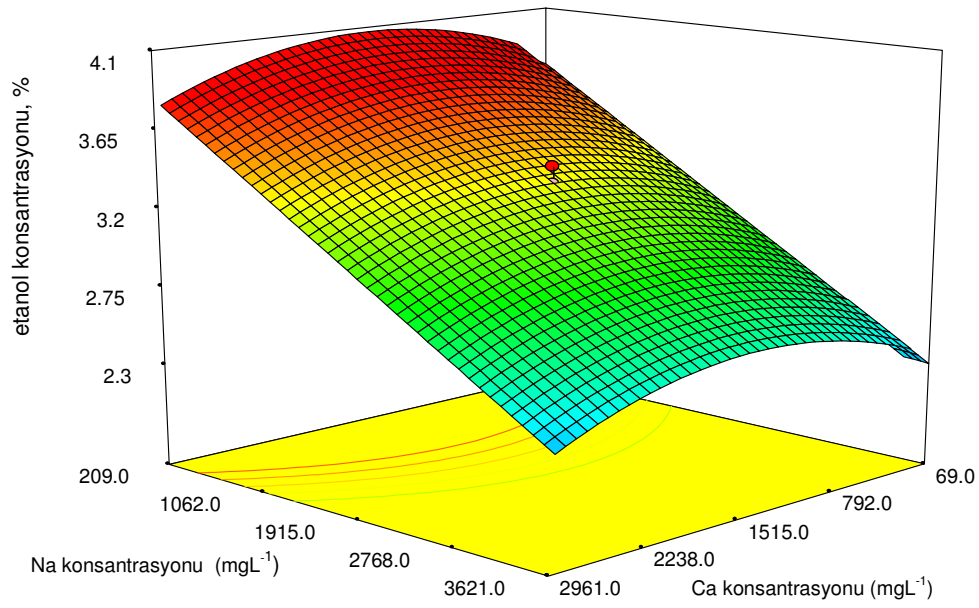
Katsayı	Katsayı değeri	Değişkenler	p değeri
<b>a</b>	4,44	-	0,0000
<b>b</b>	-	$X_1$	-
<b>c</b>	2,45	$X_2$	0,0001
<b>d</b>	-	$X_3$	-
<b>e</b>	0,14	$X_1^2$	0,0463
<b>g</b>	-	$X_2^2$	-
<b>s</b>	1,69	$X_3^2$	0,0001
<b>n</b>	-	$X_1*X_2$	-
<b>m</b>	0,24	$X_1*X_3$	0,0117
<b>z</b>	-	$X_2*X_3$	-

$$Y=4,44+2,45 X_2+ 0,14 X_1^2+ 1,69 X_3^2 + 0,24 X_1X_3 \quad (4.8)$$

Bu denklem için hesaplanan korelasyon katsayısı ( $R^2$  değeri) 0,91 olarak bulunmuştur. Bu sonuç, modelin sistemi iyi ifade ettiğini göstermektedir.

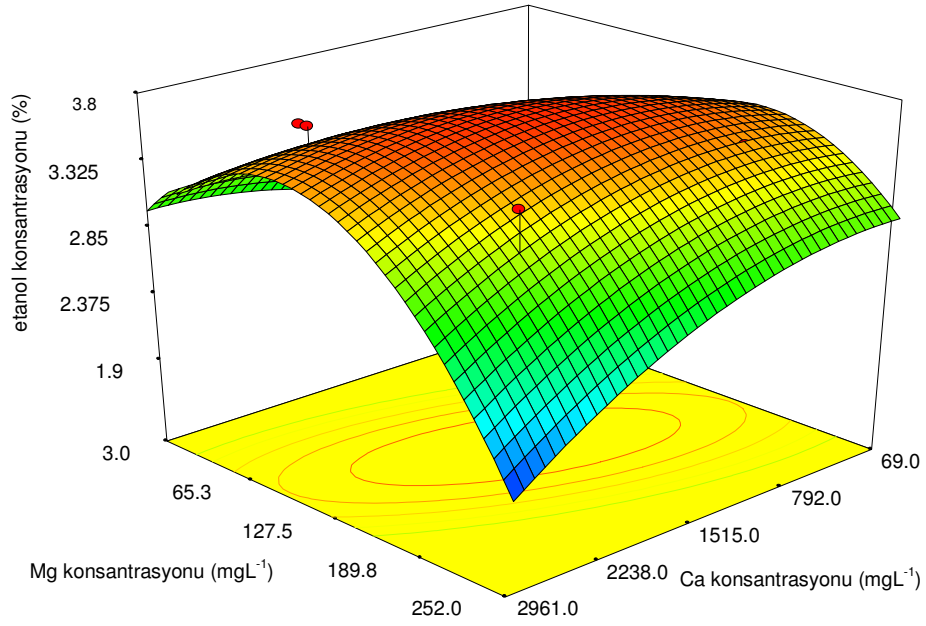
Çizilen grafiklerden görüldüğü gibi (Şekil, 4.19-4.20-4.21), araştırılan derişim aralıklarında, Na'un en düşük ( $930 \text{ mgL}^{-1}$ ), Ca'un orta ( $1515 \text{ mgL}^{-1}$ ) ve Mg'un orta ( $128 \text{ mgL}^{-1}$ ) kodlanmış değerlerinde en yüksek etanol derişimi  $3,73 \text{ vv}^{-1}$  olarak belirlenmiştir.

Şekil 4.19 incelendiğinde Na'un azalan derişimlerinde ve Ca'un orta değerinde ( $1515 \text{ mgL}^{-1}$ ) etanol verimi artmıştır.



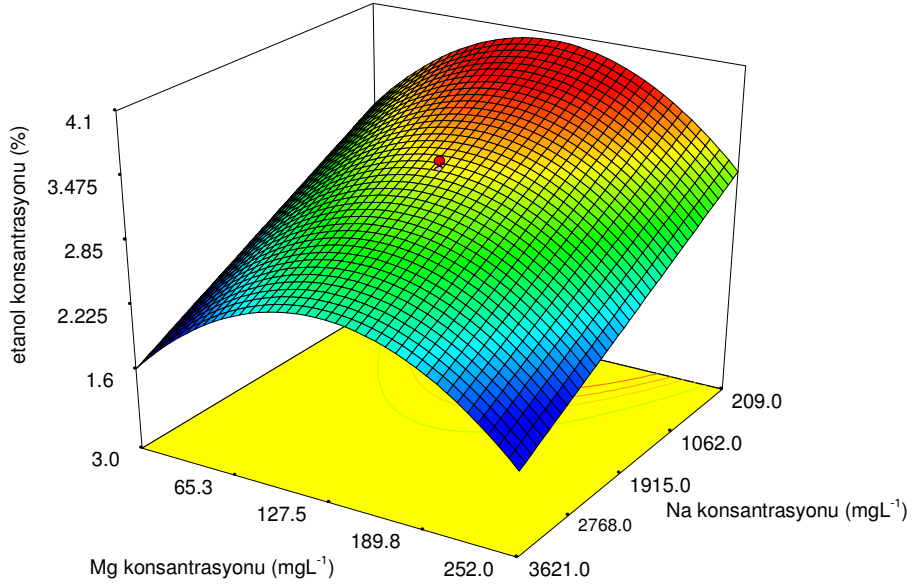
Şekil 4.19. Mg derişiminin optimum değerinde Y'nin (üretilen etanol derişiminin), Na ve Ca'un fonksiyonu olarak üç boyutlu gösterimi.

Şekil 4.20'ye bakıldığında Na derişimi optimum düzeyde olduğunda Ca'un azalan derişimlerinde etanol verimi artmıştır.



Şekil 4.20. Na derişiminin optimum değeriinde Y'nin (üretilen etanol derişiminin), Mg ve Ca'un fonksiyonu olarak üç boyutlu gösterimi.

Şekil 4.21 incelendiğinde Ca derişimi optimum değerde tutulduğunda Na'un azalan değerlerinde, Mg'un orta değerlerinde etanol veriminin arttığı görülmektedir.



Şekil 4.21. Ca derişiminin optimum değerde Y'nin (üretilen etanol derişiminin), Na ve Mg'un fonksiyonu olarak üç boyutlu gösterimi.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Literatürde, *Saccharomyces* türlerinin belli metal iyonu derişimlerinde, hücre aktivitelerinin dolayısıyla fermentasyon özelliklerinin olumsuz yönde etkilendiği belirlenmiştir [35-36]. Bu nedenle hazırlanan fermentasyon ortamında, zehirleyici derişimde olabileceği düşünölen Mn, Mg, K, Na ve Zn iyonları sırasıyla litrede 10 mg, 100 mg, 7900 mg, 930 mg ve 3 mg olacak şekilde ayarlanarak litrede 200 g ve 300 g şeker derişimi varlığında fermentasyon gerçekleştirilmiş bu şartlar altında en düşük teorik verim  $300 \text{ gL}^{-1}$  şeker varlığında tespit edilmiştir.
- Litrede 300 g sakkaroz miktarı, *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizmasının aktivitesi üzerinde zehirleyici etki oluşturduğu ve ortam şartları, zehirleyici derişimde olabileceği düşünölen metal iyonları azaltılarak iyileştirildiği için beklenen teorik verim elde edilememiş, ortama ilave edilen katkı maddelerinin etkisi yeterince gözlenememiştir.
- NaY'nin fermentasyon ortamına eklenmesiyle yapısındaki Na iyonu sayesinde fazla miktardaki zehirleyici metal iyonlarını azaltarak etanol derişimini ve üretim hızını arttırdığı düşünölmüştür. Ayrıca NaY içeren fermentasyon ortamlarının pH değerlerine bakıldığında NaY'nin pH düzenleyiciü gibi davrandığı düşünölmüştür. Etanol verimini ve hızını arttırmak için ortama eklenmesi halinde en iyi NaY miktarının  $15 \text{ gL}^{-1}$  olduğu sonucuna varılmıştır.
- Fermentasyon ortamına MNT eklenmesiyle etanol derişimi ve üretim hızında çok az bir artış belirlenmiştir. MNT'nin fermentasyon ortamının pH değışimi üzerinde etkisi olmadığı belirlenmiştir.
- KLN'nin ortamda bulunmasıyla etanol üretim hızında artış belirlenmiştir. Özellikle  $200 \text{ gL}^{-1}$  şeker varlığında üretim hızında %50 artış gözlenmiştir.

- KLN'nin fermentasyon ortamının pH değişimi üzerinde etkisi olmadığı belirlenmiştir.
- Çalışmanın ikinci bölümünde 100 gL<sup>-1</sup> sakkaroz içeren yapay melas ortamında uygun bentonit miktarı 10 gL<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. En yüksek etanol verimine 24. saatte ulaşılmış (3,59 gL<sup>-1</sup> etanol), kontrol ortama göre % 6 lık bir artış gözlenmiştir.
- Aktif karbonun etanol verimine çok fazla bir katkısı olmamış, etanol üretimi hızı üzerinde daha etkili olmuştur. Aktif karbonun eklenmesiyle kontrol ortama göre pH da fazla değişim gözlenmemiştir.
- Fermentasyon ortamına talk ilavesi fermentasyonu olumsuz yönde etkilemiştir. Bileşiminde bulunan magnezyum, silisyum, alüminyum ve demir oksitler maya üzerine zehirleyici etki göstermiş olabilir.
- Na, Ca ve Mg iyonlarının etanol derişimini en yüksek yapan değerlerini belirlemek için Box-Wilson tasarım yöntemi kullanılmıştır. Na iyonunun azalan değerlerinde etanol verimi artmıştır. Ca derişiminin etanol verimine tek başına bir etkisi olmadığı, Na ve Mg iyonlarının değişimiyle verime etkisinin olduğu belirlenmiştir. Mg<sup>2+</sup> iyonları Na iyonunun optimum değerinde Ca iyonlarına göre daha etkili olmuştur. .
- Fermentasyon ortamına eklenen bu maddeler etanol verimini arttırmaktan ziyade etanol üretim hızını arttırmak amaçlı kullanılmalıdır.
- Ortama teorik verimi arttırmak amacıyla ilave edilen zeolit ve killerin fermentasyonun hangi parametresi üzerinde etkili olduğunu belirleyebilmek amacıyla fermentasyon öncesi ve sonrası ortamdaki biyokütle gelişimi ve metal iyonlarının derişimi takip edilebilir.

### KAYNAKLAR

1. Kavas, F., Leblebici M., “ Kalite ve İşletme Kontrol Laboratuvarları El Kitabı”, *T.Ş.F.A.Ş*, Ankara, 260-261 (2004).
2. Couper, A.S., “On a New Chemical Theory”, *Philosophical Magazine*, 16: 104-116 (1958).
3. Hennel, H., “On the mutual action of sulphuric acid and alcohol, and on the nature of the process by which ether is formed”, *Philosophical Transactions*, 118: 365-371, (1828).
4. Lodgson, J.E., “Ethanol”, 4th ed. vol. 9, John Wiley & Sons, *In J.I. Kroschwitz (Ed.) Encyclopedia of Chemical Technology*, New York, 820., (1994).
5. Lodgson, J.E., “Ethanol”, 4th ed. vol. 9, John Wiley & Sons, *In J.I. Kroschwitz (Ed.) Encyclopedia of Chemical Technology*, New York, 817., (1994).
6. Gürel, Ö., “Melastan fermantasyon yoluyla etanol elde edilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 11-12 (1996).
7. Sarıkaya, A., “Fermantasyonla etil alkol üretimi”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 12 (1998).
8. Favela, E., “The effect of pH, temperature and sucrose concentration on high productivity continuous ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis*”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27(2), 121-128 (1987).
9. Pramanik, K., “Parametric studies on batch alcohol fermentation using *Saccharomyces crevisiae* yeast extracted from tody”, *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 34 (4): 487-492 (2003).
10. Ngang, E., “Alcoholic fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on yeast fermentation parameters” , *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31(2), 125-128 (2004).
11. Brown, S.W., “Ethanol inhibition of yeast growth and fermentation: Differences in the magnitude and complexity of the effect”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 11(3), 151-155 (1981).
12. Ryan, D., Johnson, R., “Dialysis and ultrafiltration of molasses for fermentation enhancement”, *Seperation Purification Technology*, 22 : 239-245 (2001).



13. Kirk, A., "The effect of potassium and chloride ions on the ethanolic fermentation of sucrose by *Zymomonas mobilis* 2716", ***Applied Microbiology and Biotechnology***, 37(1) : 88-93 (1992).
14. Chandrasena, G., Walker, G.M., "Use of surface to investigate metal ion interaction in yeast fermentations", ***Journal American Soc. Brew. Chem.***, 55(1) : 24-29 (1997).
15. Vriesekoop, F., Rasmusson, M., Pamment, N.B., "Respective effects of sodium and chloride ions on filament formation and growth and ethanol production in *Zymomonas mobilis* fermentation", ***Letters in Applied Microbiology***, 35(1):27-31 (2002).
16. Garcia, M.J., Rios, G., Ali, R., Belles, J.M., Serrano R., "Comparative physiology of salt tolerance in *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*", ***Microbiology***, 143 : 1125-1131 (1997).
17. Prista, C., Almagro, A., Dias, L., Ramos, J., "Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*", ***Applied and Environmental Microbiology***, 63 (10) : 4005-4009 (1997).
18. Kreder, G.C., "Yeast assimilation of trub-bond zine", ***Journal American Soc. Brew. Chem.***, 57 (4): 129-132 (1999).
19. Walker, G.M., "Magnesium as a stres-protectant for industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*", ***Journal American Soc. Brew. Chem.***, 56(3): 109-113 (1998).
20. Mahler, G., "Effect of magnesium ions on fermentative and respirative functions in *Pichia stipitis* under oxygen restricted growth", ***Microbiology Research***, 155 (1) : 31-5 (2000).
21. Pironcheva, GL., "Effect of magnesium ions during beer fermentation", ***Cytobios***, 94 (377) : 135-9 (1998).
22. Göksungur, Y., "Production of ethanol from beet molasses by Ca- alginate immobilized yeast cells in a packed-bed bioreactor", ***Biotechnol. Bioeng.***, 25: 265-275 (2001).
23. Sreekumar, O., Basappa S., "Effect of calcium and sodium salts on ethanol production in high sugar fermentation by free cells of *Zymomonas mobilis*", ***Biotechnology Letters***, 4(6) : 511-514 (1992).

24. Roque R., Delgado R., Contreras C., Lago A., "Behaviour of yeast fermentation in the presence of zeolite", *Biotechnology Letters*, 9 (9): 640-642 (1987).
25. Bauman, M., Mesaric, M., Ribar, S., Maric, V., Tudja, M., "Natural zeolite clinoptilolite increases the concentrations of sphingoid bases in the yeast *Yarrowia lipolytica*", *Journal of Basic Microbiology*, 41(1) : 7-16 (2001).
26. Ergun M., Mutlu F., Gürel Ö., "Effect of addition of EDTA, Ferrocynide and Zeolite X on ethanol fermentation of molasses", *J. Chem.Tech. Biotechnology.*, 68:147 -150 (1997).
27. Siva Raman, H., Chandwadkar, A., Baliga, S.A., Prabhune, A.A., "Effect of synthetic zeolite on ethanolic fermentation of sugarcane molasses", *Enzyme Microb. Technol*, 16:719-722 (1994).
28. Alfenore, S., Moline, C., Guillouet, J.L., Gome, G., Benbadis, L., "Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60:67-72 (2002).
29. Ikegami, T., " Accelerated ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* with addition of activated carbon", *Biotechnology Letters*, 22 : 1661-1665, (2000).
30. Ikegami, T., " Acceleration of yeast growth by addition of carbon to cultivation medium", *Biotechnology Letters*, 20 (7): 673-677 (1998).
31. Özer, Ö., "*Pichia stipitis* mayası ile fermantasyonla etil alkol eldesi", Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 35-37 (2003).
32. Tosun, A., "Yapay melastan fermantasyon yoluyla etanol üretimine fermantasyon ortamına eklenen maddelerin etkisi", Doktora Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 83-115 (2005).
33. Narendranath, V., Thomas, C., Ingledew, M., "Acetic acid and lactic acid inhibition of growth of *Saccharomyces cerevisiae* by different mechanism", *J.Am.Soc. Brew.Chem.*, 59(4) : 187-194 (2001) .
34. Zorpas, A.A., Constantinides, T., et. Al., " Heavy metal uptake by natural zeolite and metals partitioning in sewage sludge compost", *Bioresource Tech.*, 72, 113-119 (2000).
35. Soares, E.V., Hebbelinck , K., Soares, H., "Toxic effect caused by heavy metals in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a comparative study", *Can. J. Microbiol./Rev. Can. Microbiol.*, 49 (5) : 336-343 (2003).

36. Perego, P., Howell S.B., “ Molecular mechanisms controlling sensitivity to toxic metal ions in yeast”, *Toxicol Apply Pharmacology*, 147(2) : 312-318 (1997).
37. Perry, R. H., Chilton, C.H., “Chemical engineers handbook, 5<sup>th</sup> edition”, *McGraw- Hill Book Company*, Tokyo, 74 (1973).

**EKLER**

## EK-1. Logaritmik büyüme eğrisi için kullanılan veriler

Çizelge 1.1. Logaritmik büyüme eğrisi için kullanılan veriler

Süre, saat	Absorbans (600 nm)
1	1,20
2	1,35
3	1,63
4	-
5	-
6	3,00
7	3,20
8	3,50
9	4,00
10	4,50
11	5,50
12	6,00
13	10,00
14	11,96
15	12,80
16	14,20
17	15,00
18	16,40
19	18,45
20	22,06
21	22,35
22	24,68
23	23,71
24	25,50
25	26,52
26	26,10
27	26,20
28	26,00
29	26,00
30	26,00
31	26,00
32	26,00

EK-2. NaY'nin değişen derişimlerinde elde edilen veriler

Çizelge 2.1. 300 gL<sup>-1</sup> Sakkaroz varlığında etanol derişimi (vv<sup>-1</sup>)- süre(s) verileri

Süre, saat	5 gL <sup>-1</sup> NaY	10 gL <sup>-1</sup> NaY	15 gL <sup>-1</sup> NaY	kontrol
24	4.66	5.45	5.75	4.95
32	5.66	6.16	6.44	5.75
36	6.16	6.44	7.10	6.10

Çizelge 2.2. 200 gL<sup>-1</sup> Sakkaroz varlığında etanol derişimi (vv<sup>-1</sup>)- süre (s) değerleri

Süre, saat	15 gL <sup>-1</sup> NaY	Kontrol
16	1.9	2.07
24	5.7	6.20
32	7.3	6.48
36	6.9	7

EK-2 (Devam) NaY'nin değişen derişimlerinde elde edilen veriler

Çizelge 2.3. 300 gL<sup>-1</sup> Sakkaroz varlığında pH- süre (s) değerleri

Süre, saat	5 gL <sup>-1</sup>	10 gL <sup>-1</sup>	15 gL <sup>-1</sup>	kontrol
0	4.5	4.5	4.5	4.5
24	3.92	3.94	3.96	3.35
32	3.78	3.89	3.9	3.38
36	3.91	3.95	3.96	3.28

Çizelge 2.4. 200 gL<sup>-1</sup> Sakkaroz varlığında pH- süre (s) değerleri

Süre, saat	NaY 15 gL <sup>-1</sup>	kontrol
0	4.5	4.5
16	4.52	3.9
24	3.91	3.28
32	4.33	3.36
36	3.707	3.07

## EK-3. MNT'nin değişen derişimlerinde elde edilen değerler

Çizelge 3.1. 300 gL<sup>-1</sup> Sakkaroz varlığında etanol derişimi (v/v)- süre (s) verileri

Süre, saat	5 gL <sup>-1</sup> MNT	10 gL <sup>-1</sup> MNT	15 gL <sup>-1</sup> MNT	kontrol
16	2.7	3.53	2.53	3.3
32	3.1	4.5	3.5	4.24
36	5.92	6.22	5.72	6.10

Çizelge 3.2. 200 gL<sup>-1</sup> Sakkaroz varlığında etanol derişimi (v/v)- süre (s) verileri

Süre, saat	10 gL <sup>-1</sup> MNT	Kontrol
16	1.95	2.07
24	6.05	6.2
32	7.22	6.48
36	6.55	7



EK-3 (Devam) MNT'nin değişen derişimlerinde elde edilen değerler

Çizelge 3.3. 300 gL<sup>-1</sup> Sakkaroz varlığında pH- süre (s) değerleri

Süre, saat	5 gL <sup>-1</sup> MNT	10 gL <sup>-1</sup> MNT	15 gL <sup>-1</sup> MNT	kontrol
0	4.5	4.5	4.5	4.5
24	3.46	3.48	3.57	3.35
32	3.35	3.37	3.42	3.38
36	3.32	3.36	3.45	3.28

Çizelge 3.4. 200 gL<sup>-1</sup> Sakkaroz varlığında pH- süre (s) değerleri

Süre, saat	10 gL <sup>-1</sup> MNT	kontrol
0	4.5	4.5
16	3.863	3.9
24	3.2	3.28
32	3.30	3.36
36	2.98	3.07

## EK- 4. KLN'nin değişen derişimlerinde elde edilen değerler

Çizelge 4.1. 300 gL<sup>-1</sup> Sakkaroz varlığında etanol derişimi (v/v)- süre (s) verileri

Süre, saat	5 gL <sup>-1</sup> KLN	10 gL <sup>-1</sup> KLN	15 gL <sup>-1</sup> KLN	kontrol
24	3.8	1.3	4.95	4.95
32	5.76	4.5	5.75	5.75
36	6.69	5.9	5.6	6.10

Çizelge 4.2. 200 gL<sup>-1</sup> Sakkaroz varlığında etanol derişimi (v/v)- süre (s) verileri

Süre, saat	5 gL <sup>-1</sup> KLN	Kontrol
16	2.19	2.07
24	7	6.2
32	6.72	6.48
36	6.37	7

EK- 4 (Devam) KLN'nin değişen derişimlerinde elde edilen değerler

Çizelge 4.3. 300 gL<sup>-1</sup> Sakkaroz varlığında pH- süre (s) değerleri

Süre, saat	5 gL <sup>-1</sup> KLN	10 gL <sup>-1</sup> KLN	15 gL <sup>-1</sup> KLN	kontrol
0	4.5	4.5	4.5	4.5
24	3.39	3.4	3.49	3.35
32	3.25	3.69	3.55	3.38
36	3.26	3.31	3.28	3.28

Çizelge 4.4. Çizelge 4.4. 200 gL<sup>-1</sup> Sakkaroz varlığında pH- süre (s) değerleri

Süre, saat	5 gL <sup>-1</sup> KLN	kontrol
0	4.5	4.5
16	3.37	3.9
24	3.241	3.28
32	3.34	3.36
36	3.03	3.07

## EK-5. Bentonitin değişen derişimlerinde elde edilen değerler

Çizelge 5.1. 100 gL<sup>-1</sup> Sakkaroz varlığında etanol derişimi (v/v)- süre (s) verileri

Süre, saat	Bentonit 10 gL <sup>-1</sup>	Bentonit 50 gL <sup>-1</sup>	Bentonit 100 gL <sup>-1</sup>	kontrol
18	2.02	2.99	3.15	2.99
24	3.59	3.45	2.85	3.3
32	2.94	3.08	3.15	2.96

Çizelge 5.2. 100 gL<sup>-1</sup> Sakkaroz varlığında pH değişimi- süre (s) verileri

Süre, saat	10 gL <sup>-1</sup> bentonit	50 gL <sup>-1</sup> bentonit	100 gL <sup>-1</sup> bentonit	kontrol
0	4,5	4,5	4,5	4,5
18	3,67	4,05	4,18	2,99
24	3.44	4.06	4.38	3,3
32	3.55	4.33	4.81	2,96

## EK-6. Aktif karbonun değişen derişimlerinde elde edilen değerler

Çizelge 6.1. 100 gL<sup>-1</sup> Sakkaroz varlığında etanol derişimleri (v/v)- süre (s) verileri

Süre, saat	Aktif karbon 5 gL <sup>-1</sup>	Aktif Karbon 10 gL <sup>-1</sup>	Aktif karbon 30 gL <sup>-1</sup>	Aktif karbon 100 gL <sup>-1</sup>	kontrol
18	3,29	3,4	3,27	2,65	2,99
24	2,94	3,28	3,082	3,17	3,3
32	3,34	2,85	2,83	2,42	2,96

Çizelge 6.2. 100 gL<sup>-1</sup> Sakkaroz varlığında pH değişimi- süre (s) verileri

Süre, saat	5 gL <sup>-1</sup>	10 gL <sup>-1</sup>	30 gL <sup>-1</sup>	100 gL <sup>-1</sup>	kontrol
0	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
18	3,6	3,24	3,28	3,38	3,3
24	3,34	3,31	3,38	3,52	3,3
32	3,34	3,21	3,29	3,52	3,33

## EK-7. Talk'un değişen derişimlerinde elde edilen değerler

Çizelge 7.1. 100 g/L Sakkaroz varlığında etanol derişimi (v/v)- süre (s) verileri

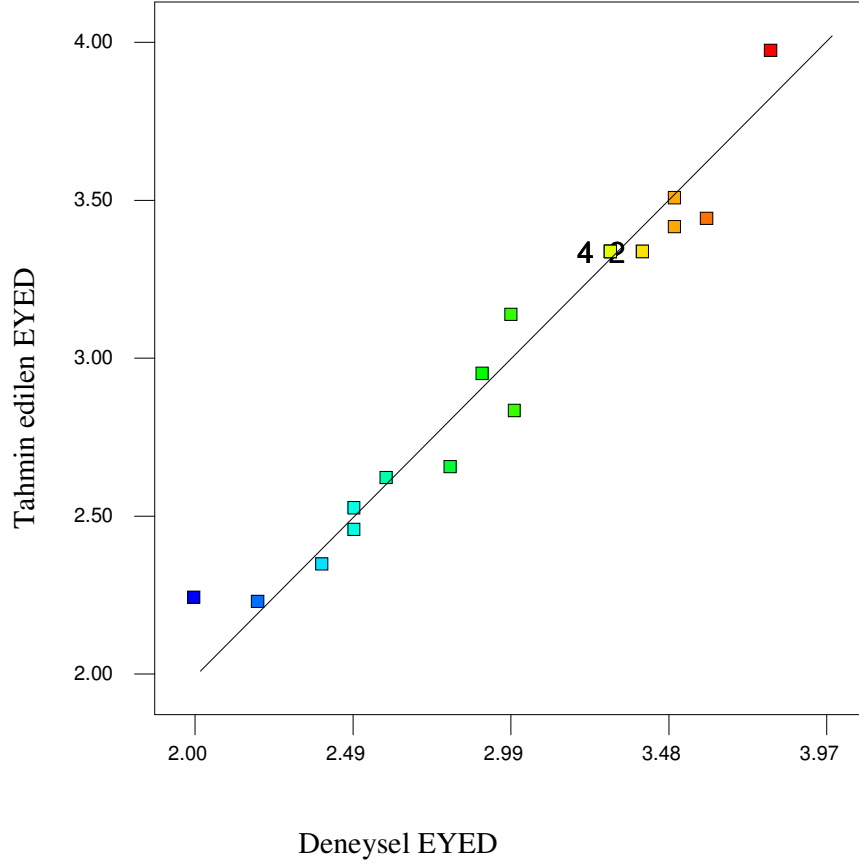
Süre, saat	Talk 10 gL <sup>-1</sup>	Talk 50 gL <sup>-1</sup>	Talk 100 gL <sup>-1</sup>	kontrol
18	0,28	0,30	0,30	2,99
24	-0,53	0,46	0,16	3,3
32	0,02	0,07	-0,02	2,96

EK-8. 1999 yılı kampanya ortalaması melas analizlerinden alınan değerler

Çizelge 8.1. 1999 yılı kampanya ortalaması melas analizlerinden alınan değerler

	<b>MAKSİMUM (mg/kg)</b>	<b>MİNİMUM (mg/kg)</b>
<b>Ca</b>	11710 (ÇARŞAMBA)	4284 (KARS)
<b>Na</b>	14 256 (ELAZIĞ)	4 632 (YOZGAT)
<b>Mg</b>	996 (ANKARA)	278 (ÇARŞAMBA)

EK-9. Deneysel ve bilgisayar programında hesaplanan EYED grafiği



Şekil 9.1. Deneysel ve bilgisayar programında hesaplanan EYED grafiği



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : SOYUDURU, Dilek  
Uyruğu : T.C.  
Doğum tarihi ve yeri : 03.01.2007 Yozgat  
Medeni hali : Bekar  
Telefon : 0 (312) 409 60 24  
e-mail : dsoyuduru2002@yahoo.com

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Kimya Mühendisliği	2004
Lise	Çağrı Fen Lisesi	1999

### Yabancı Dil

İngilizce

### Hobiler

Kitap okumak, müzik dinlemek, satranç oynamak